

**Auswirkungen von Schadgasen und
2, 2'-Bispyridin auf Photosynthesepigmente**

Annette Sappok

Disbui. München

1989





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Auswirkungen von Schadgasen und
2, 2'-Bispyridin auf Photosynthesepigmente

Dissertation
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Annette Sappok
aus Aschaffenburg

Januar 1989

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rüdiger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Scheer

Tag der mündlichen Prüfung: 20.04.1989

Anfang und Ende sind wie ein Kreis:
wo das Ende ist, ist auch der Anfang.

(Lao - Tse)

Abkürzungen

Ant	Antheraxanthin
c	Konzentration
Chl	Chlorophyll
Chlid	Chlorophyllid
D	Durchschnittswert
Fg	Frischgewicht
Lu	Lutein
LuE	Luteinepoxid
Neo	Neoxanthin
PAN	Peroxyacetylnitrat
Phe	Pheophytin
Protochlid	Protochlorophyllid
Protopheid	Protopheophorbid
Viol	Violaxanthin
Zea	Zeaxanthin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.	1
2	Materialien und Methoden.	12
2.1	Chemikalien und Lösungsmittel	12
2.2	Geräte.	12
2.3	HPLC-Systeme.	13
2.4	Analytische Dünnschichtchromatographie.	14
2.5	Herstellung der Pigmentlösungen	14
2.5.1	Chlorophyll a	14
2.5.2	β -Carotin	14
2.6	Sicherheitsvorkehrungen	15
2.7	Isolierung von Chlorophyllen.	15
2.7.1	Chlorophyll a	15
2.7.2	Chlorophyll b	16
2.8	Gewinnung und Reinigung der Thylakoide.	17
2.9	Aufbereitung der Thylakoide	17
2.10	Herstellung der Gase SO_2 , NO_x und Ozon	17
2.10.1	SO_2 und NO_x	17
2.10.2	Ozon.	18
2.11	Umrechnung der Gasmengen in ppm	18
2.11.1	SO_2 , NO_x	18
2.11.2	Ozon.	18
2.12	Pflanzenmaterial.	19
2.12.1	Anzucht von Hafer (<i>Avena sativa</i>).	19
2.12.1.1	Grüner Hafer.	19
2.12.1.2	Etiolierter Hafer	19
2.12.2	Tamariskenmoos (<i>Thuidium tamariscinum</i>).	20
2.12.3	Fichten (<i>Picea abies</i>)	20
2.12.4	Linden (<i>Tilia platyphyllos</i>)	20
2.13	Pigmentextraktionen	21
2.13.1	Aus grünen Pflanzen	21
2.13.2	Aus etioliertem Hafer	21
2.14	Ermittlung von absoluten Pigmentgehalten durch HPLC	22
2.15	Quantitative Pigmentbestimmungen in etioliertem Hafer	24

2.16	Herkunft, Gewinnung und Identifikation von Eichsubstanzen zur quantitativen Pigmentbe- stimmung mittels HPLC	25
2.16.1	Chlorophyll a, Chlorophyll b und β -Carotin. .	25
2.16.2	Xanthophylle.	25
3	Experimenteller Teil.	26
3.1	Quantitative Pigmentanalysen.	26
3.1.1	Begasung von Pigmentlösungen, Thylakoidsus- pensionen und Pflanzen im Licht und im Dunkeln	26
3.1.1.1	Begasung von Pigmentlösungen.	27
3.1.1.2	Begasung von Thylakoidsuspensionen.	27
3.1.1.3	Begasung von Pflanzen	27
3.1.2	Pigmentextraktion aus Thylakoiden und Pflanzen sowie quantitative Pigmentbestimmung	28
3.1.2.1	Aus Pflanzen.	28
3.1.2.2	Aus Thylakoiden	28
3.1.3	Versuche zur Seneszenz.	28
3.1.3.1	Induktion der Seneszenz	28
3.1.3.2	Extraktion und quantitative Auswertung der Pigmente	29
3.1.4	Versuche zur Chlorophyllbiosynthese	29
3.1.4.1	Belichtung von etioliertem Hafer nach NO_x -Begasung	29
3.1.4.2	Belichtung von 2, 2'-bispyridinbehandeltem Hafer	29
3.1.4.3	Blitzbelichtung von etioliertem, 2, 2'-bispyridin behandeltem Hafer	30
3.1.4.4	Bestimmung der Veresterungsrate nach Schadgaseinwirkung	30
3.1.4.5	Unter Einwirkung von 2, 2'-Bispyridin	31
3.1.5	Carotinoidanalysen von schadgas- sowie von 2, 2'-bispyridinbehandeltem Hafer	31
3.1.6	Statistik	31
3.2	Qualitative Pigmentanalysen	32
3.2.1	Durchführung der Begasungsversuche.	32

3.2.2	Überführung der Pigmente in Ether	32
3.2.3	Pheophytinisierung der Chlorophyllderivate X sowie Darstellung von Pheophytin aus Chlorophyll a	33
3.2.4	Darstellung von Pheophorbid a	33
3.2.5	Phasentest nach Molisch (1896).	34
3.2.6	Ermittlung der Schwellenwerte für das Auftreten schadstoffspezifischer Abbauprodukt	34
3.3	Freilanduntersuchungen.	34
3.3.1	Herkunft des Pflanzenmaterials und Standortbeschreibung	34
3.3.2	Pigmentextraktion und Ermittlung des absoluten Pigmentgehaltes	35
3.3.3	Statistische Berechnungen	36
4	Ergebnisse.	37
4.1	Quantitative Pigmentanalysen.	37
4.1.1	Begasung unter Lichtausschluß	37
4.1.1.1	Begasung von freiem Chlorophyll a	37
4.1.1.2	Begasung von thylakoid-gebundenem Chlorophyll	39
4.1.1.3	Begasung von Hafer.	40
4.1.2	Begasung im Licht	41
4.1.2.1	Begasung von freiem Chlorophyll a	41
4.1.2.2	Begasung von thylakoid-gebundenem Chlorophyll	44
4.1.2.3	Begasung von freiem β -Carotin	46
4.1.2.4	Begasung von thylakoid-gebundenem β -Carotin	48
4.1.2.5	Begasung von thylakoid-gebundenen Xanthophyllen	51
4.1.2.6	Begasung von Hafer mit SO_2 , NO_x sowie mit SO_2/NO_x	53
4.1.2.7	Begasung von Hafer mit Ozon	54
4.1.2.8	Begasung von Hafer mit Ozon in Kombination mit SO_2 und NO_x	55
4.1.2.9	Quantitative Veränderungen im Carotinoidhaushalt von Haferpflanzen	57
4.1.3	Quantitative Pigmentveränderungen in	

	Haferpflanzen	60
4.1.4	Quantitative Pigmentveränderungen in etiolierten Haferpflanzen	66
4.1.4.1	Versuche zur Chlorophyllbiosynthese	66
4.1.4.2	Carotinoidanalysen.	69
4.2	Qualitative Pigmentanalysen	70
4.2.1	Begasung unter Lichtausschluß	71
4.2.1.1	Begasung von Chlorophyll und Thylakoiden mit NO_x	71
4.2.1.2	Begasung von Hafer mit NO_x	78
4.2.1.3	Versuche zur Charakterisierung der Produkte X	80
4.2.1.4	Begasung von Chlorophyll a mit SO_2	85
4.2.1.5	Begasung von Chlorophyll a mit einem Gemisch von SO_2 und NO_x	87
4.2.1.6	Begasung von Thylakoiden und Hafer mit SO_2 sowie mit SO_2/NO_x	88
4.2.2	Begasungen im Licht	89
4.2.2.1	Begasung von Chlorophyll a und Thylakoiden mit SO_2 , NO_x sowie mit SO_2/NO_x	89
4.2.2.2	Begasung von β -Carotin mit NO_x	91
4.2.2.3	Begasung von β -Carotin mit SO_2/NO_x	93
4.2.2.4	Begasungen von Pflanzen	93
4.3	Freilanduntersuchungen.	97
5	Diskussion.	107
5.1	Quantitative Pigmentanalysen.	107
5.1.1	Begasung von reinem Chl a und Thylakoiden	107
5.1.1.1	Mit NO_x	107
5.1.1.2	Mit SO_2	110
5.1.1.3	Mit SO_2/NO_x	111
5.1.1.4	Begasung von reinem Chlorophyll a mit Ozon.	113
5.1.2	Reaktionen von Chlorophyll mit Schadgasen in intakten Pflanzen	114
5.1.3	Verhalten von β -Carotin unter Schadstoffeinfluß	118
5.1.3.1	Freies und thylakoid-gebundenes β -Carotin	118

5.1.3.2	Verhalten und Funktion von β -Carotin in intakten Pflanzen	120
5.1.4	Verhalten der Xanthophylle unter Schadgaseinfluß	121
5.1.5	Vergleich der Pigmentgehalte während der Sensezenz und nach NO_x -Begasung	124
5.1.6	Vergleich der Pigmentgehalte in etioliertem Hafer	127
5.2	Qualitative Pigmentanalysen	132
5.2.1	Begasung von reinem Chlorophyll a	132
5.2.1.1	Mit NO_x	132
5.2.1.2	Begasung von Chlorophyll a und Thylakoiden mit SO_2 , sowie mit SO_2/NO_x	138
5.2.2	Begasung von reinem β -Carotin mit SO_2 , NO_x und SO_2/NO_x	141
5.2.3	Begasung von Pflanzen mit SO_2 , NO_x und SO_2/NO_x	141
5.3	Freilanduntersuchungen.	143
6	Zusammenfassung der Ergebnisse.	149
7	Literaturverzeichnis.	153

1 Einleitung

Die in den letzten Jahren verstärkt auftretenden neuartigen Waldschäden unterscheiden sich von den bisher bekannten Baumkrankheiten dadurch, daß nicht nur einzelne Bäume oder Baumarten befallen werden, sondern daß der Wald als gesamtes Ökosystem angegriffen und eventuell zerstört werden kann (Bartsch und Dorenbusch 1981, Braun und Sauter 1983, Ammer et al. 1985).

Die auftretenden Schäden manifestieren sich insbesondere in folgenden Symptomen:

- Zuwachsverluste (Appt et al. 1983), die sich durch schwächer ausgeprägte Jahresringe bzw. durch ihr gänzliches Fehlen nachweisen lassen. (Athari 1983, Aldinger und Kermer 1985).
- Kronenverlichtung
Nadelbäume zeigen vor allem das sog. Lametta- sowie das Storchennestsyndrom (Schütt et al. 1983, Schütt und Cowling 1985). Ersteres äußert sich besonders in wenig benadelten, herunterhängenden Trieben, während mit letzterer Bezeichnung eine Stauchung der Wipfelregion gemeint ist.

Bei Laubbäumen kommt es in Verbindung mit dem geringen Blattbewuchs häufig zu Kurztrieben (Bartels 1985) und zu einem Einrollen der Blätter, so daß die Blattunterseite nach außen gekehrt ist.
(vergl. AFZ-Farbsonderdruck 1984).

- Verfärbung der Blattoorgane

Hierunter sind in erster Linie Vergilbungserscheinungen zu verstehen, die durch einen Chlorophyllverlust in Blättern (Schütt und Summerer 1983) und Nadeln (Kreuzer 1979, Elstner 1983, Mies und Zöttl 1985) hervorgerufen werden.

Bei Laubbäumen ist diese Pigmentdegradation nicht jahreszeitlich bedingt. Sie kann also nicht mit der natürlichen Herbstfärbung gleichgesetzt werden (Mohr 1984).

Im bayerischen Wald wird neuerdings bei Fichten unabhängig vom Alter der Bäume eine Vergilbung der älteren Nadeljahrgänge registriert, während die jüngsten Triebe davon nicht betroffen sind. Auch der Verlauf dieser sog. akuten Vergilbung, die von der Nadelspitze zur Basis fortschreitet, wurde bisher noch nicht beobachtet (Kandler 1985).

- Neben diesen sichtbaren Symptomen der oberirdischen Pflanzenteile wird auch von Wurzelschäden berichtet, die sich besonders in einer verminderten Feinbewurzelung äußern (Blaschke et al. 1985, Schönbeck und Meyer 1985).

Seit Beginn der 80er Jahre nehmen diese Schadbilder rasch zu, was durch die folgenden Daten belegt wird: Im Jahre 1982 wurden erst 8% der Bäume in der Bundesrepublik Deutschland als geschädigt angesehen, doch bereits 2 Jahre später stieg ihre Zahl auf 50% an (Krahl-Urban und Papke 1987). Zunächst waren von dieser Entwicklung Nadelbäume besonders betroffen (Mohr 1986), jedoch zeigt Abbildung 1, daß ihnen Laubbäume inzwischen nur wenig nachstehen.

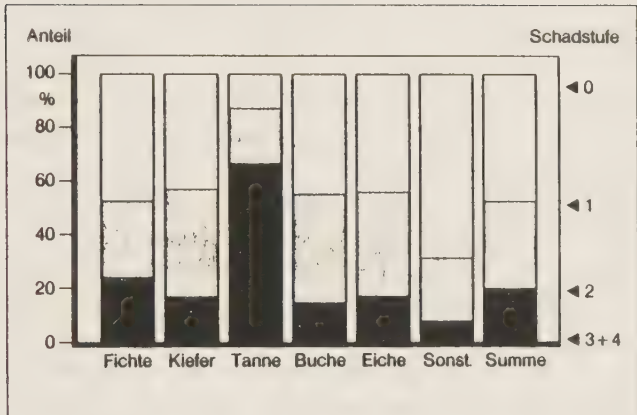


Abbildung 1: Waldschäden in der Bundesrepublik Deutschland nach Baumarten. Die Schadstufeneinteilung von 0 (keine Schäden) bis 4 (stark geschädigt) erfolgte anhand des Nadel- und Blattverlustes sowie der Vergilbung (Krahl-Urban und Papke 1987)

Die Vielfalt der auftretenden Symptome läßt sich nicht auf eine einzige Krankheit zurückführen, vielmehr handelt es sich um einen Komplex verschiedener Krankheiten, die nicht monokausal erklärt werden können (Papke et al. 1987). Es haben sich inzwischen jedoch zwei Theorien etabliert, die von unterschiedlichen Hauptauslösefaktoren ausgehen.

Kandler (1983) und Rehfuess (1983) sehen in einem epidemieartigen Befall mit Mikroorganismen die Hauptverursacher der Waldschäden.

So ist beispielsweise das Phänomen der Nadelröte auf eine Infektion durch den Pilz *Rhizosphaera kalkhoffii* zurückzuführen (Butin und Wagner 1985). Auch eine Gelbfleckigkeit

von Blättern und Nadeln kann von einem Befall mit derartigen Schüttepilzen herrühren (Braun und Sauter 1983).

Im Zusammenhang mit den akuten Vergilbungserscheinungen wird ferner ein Befall der Wurzeln mit bisher unbekannten Mikroorganismen diskutiert, der zu einer verminderten Nährstoffaufnahme führt (Kandler 1985, Kandler et al. 1987). Gestützt wird diese Theorie zum einen durch den übereinstimmenden Befund vieler Autoren, nach dem bei der akuten Vergilbung bzw. bei der Höhenerkrankung der Fichte (Zöttl und Mies 1983) ein Mineralstoffmangel vorliegt (Bosch et al. 1983, Zech und Popp 1983, Zöttl und Hüttl 1985, Zöttl und Hüttl 1986).

Bei Fichten aus dem bayerischen Wald ist beispielsweise ein Kalium/Magnesiummangel nachgewiesen worden, der durch eine entsprechende Düngung ebenso wieder behoben werden kann, wie die mit ihm verbundene Vergilbung (Senser pers. Mitteilung). Zum anderen beobachten Kandler et al. (1987) eine mehr oder weniger rasche, nestartige Ausbreitung der Vergilbung von einem Zentrum aus, wobei offenbar bereits erkrankte Bäume auch wieder ergrünen können.

Dieser Ausbreitungsmechanismus spricht ebenfalls für biotische Ursachen.

Die zweite Hypothese besagt, daß dem erhöhten Eintrag anthropogener Schadstoffe ein maßgeblicher Anteil am derzeitigen schlechten Zustand des Waldes zukommt (Prinz 1983, Schütt 1985, Seufert und Arndt 1986). Trotz intensiver Bemühungen um die Luftreinhaltung konnte in der Bundesrepublik Deutschland die Konzentration an SO_2 und organischen Verbindungen nur geringfügig gesenkt werden, während der Gehalt an Stickoxiden in den letzten Jahren sogar noch weiter zunahm (vergl. Abb. 2). Die Hauptverursacher dieser Entwicklung sind Kraft- und Heizwerke sowie der Verkehr (vergl. Abb. 3).

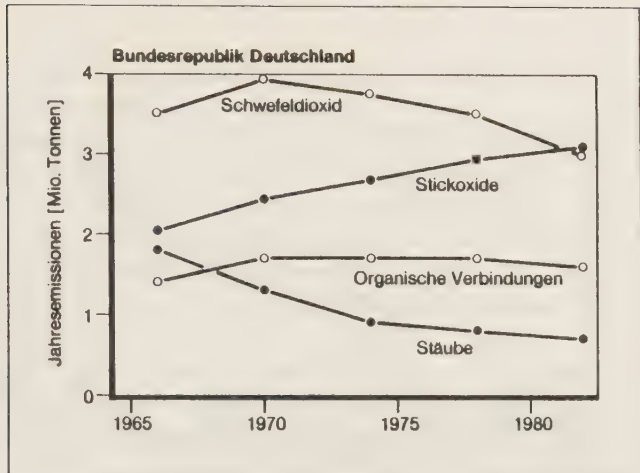


Abbildung 2: Entwicklung der Jahresemission wichtigster Luftschadstoffe in der Bundesrepublik Deutschland zwischen 1966 und 1982 (Krahl-Urban und Papke 1987)

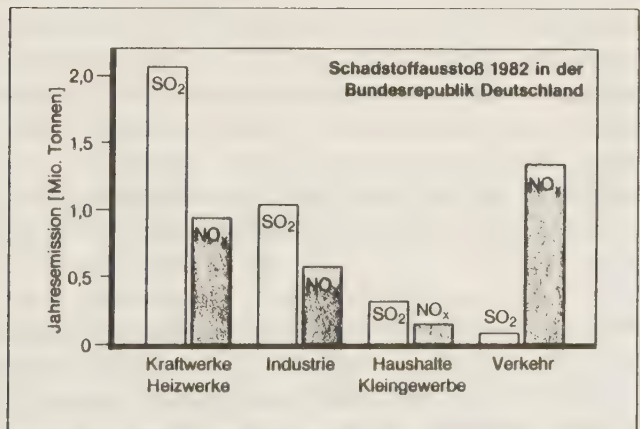


Abbildung 3: Verursacher der Emission von Schwefeldioxid und Stickoxiden in der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 1982 (Krahl-Urban und Papke 1987)

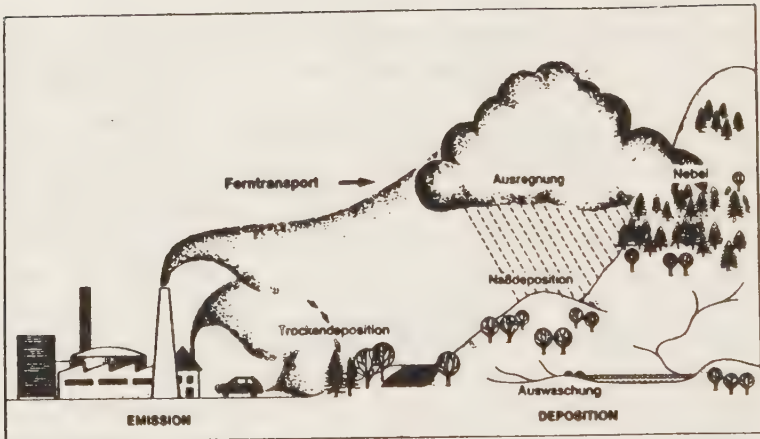


Abbildung 4: Trocken- und Naßdeposition von Schadstoffen
(Krahl-Urban und Papke 1987)

Abbildung 4 zeigt, daß der Schadgaseinfluß nicht auf die unmittelbare Nähe des Emissionsortes beschränkt ist, sondern daß eine weiträumige Verteilung stattfindet. Dies trägt unter anderem dazu bei, daß auch Bäume in sog. Reinluftgebieten betroffen sind. Insbesondere Bergwälder weisen starke Vergilbungserscheinungen auf, die man auf eine Reaktion von Schadstoffen und Pigmenten unter intensiver, energiereicher Sonneneinstrahlung zurückführt (Braun und Sauter 1983).

Durch die Ausregnung von Schadstoffen wird neben den Blattoorganen auch das Wurzelsystem getroffen. Vor allem SO_2 und NO_x führen zum sog. sauren Regen (Krapfenbauer 1984), der durch seine Toxizität sowohl eine direkte Schädigung auf die Wurzeln ausüben (Jurat et al. 1986) als auch eine Auswaschung von Nährelementen verursachen kann, so daß eine ausreichende Deckung des Nährstoffbedarfs nicht mehr möglich ist (Ulrich 1985). Regen und Nebel (Naßdeposition) wirken ebenso wie Schadstoffe in gasförmigem Zustand (Trockendeposition) auf Blätter und Nadeln, wobei Pigmentschädi-

gungen auftreten können.

Die Naßdeposition wird z.B. für eine Nährstoffauswaschung aus dem Blattgewebe verantwortlich gemacht, der durch membranschädigende Agentien wie PAN, Photooxidantien, HSO_3^- , O_3 und SO_2 noch Vorschub geleistet wird (Ulrich et al. 1979). Bei einem auftretenden Magnesiummangel wird eine Chlorophylldegradation nicht ausgeschlossen (Elstner 1983).

Die Zerstörung des grünen Blattfarbstoffes, bei der die bereits erwähnten Vergilbungssymptome sichtbar werden, ist aber auch durch gasförmige Schadstoffe möglich (Braun und Sauter 1983).

Bei der Einwirkung von Gasen auf Carotinoide ist noch nicht von derart deutlichen Ausbleichungssymptomen berichtet worden. Kändler und Ulrich (1963) stellen jedoch bei einer Stickoxidbegasung von Pflanzen eine Abnahme des β -Carotingehaltes fest, die mit der besser sichtbaren Chlorophyllausbleichung einherging.

Den raschen Abbau von Chlorophyll a und β -Carotin unter der Einwirkung von Schadgasen beschreiben auch Lichtenthaler und Buschmann (1984 a), wohingegen Xanthophylle und Chlorophyll b nach Meinung dieser Autoren vergleichsweise stabil sein sollen.

Nicht selten wird auch eine fast vollständige Zerstörung der Photosynthesepigmente beobachtet, die sich in Chlorosen oder weißen Flecken äußert (Meyer 1984).

Die Reaktion von Schadgasen mit den Photosynthesepigmenten könnte auf 2 verschiedenen Wegen erfolgen:

- auf indirektem Weg

Hier kann beispielsweise durch eine Unterdrückung von Abwehrmechanismen eine Pigmentbleichung auftreten (Bushnell und Rowell 1981).

Hoque (1982) berichtet von einem erhöhten Gehalt an p-Hydroxyacetophenon in erkrankten Fichtennadeln. Nach

Meinung des Autors fördert diese Substanz die Seneszenz und somit eine vorzeitige Vergilbung. Malhotra und Hocking (1976) beobachten bei relativ niedrigen SO_2 -Konzentrationen (5 - 10 ppm) eine erhöhte Chlorophyllaseaktivität, die mit einem Chlorophyllverlust verbunden ist. Die Peroxidation von Membranlipiden durch Luftschadstoffe wird von Kunert (1985) als Hauptursache für die Schädigung von Waldbäumen angegeben. Die dabei entstehenden sehr reaktiven Verbindungen können dann in einer Folgereaktion zu Pigmentausbleichungen führen (Holden 1965, Zimmermann und Vick 1970, Imamura und Shimizu 1974).

- auf direktem Weg

In diesem Fall tritt eine chemische Reaktion zwischen Luftschadstoff und Photosynthesepigment ein.

Über schadstoffspezifische Abbauprodukte von Carotinoiden ist bisher wenig bekannt, wohingegen derartige Derivate des Chlorophylls bereits nachgewiesen wurden, jedoch bis dato noch nicht identifiziert sind. Bei der Stickoxidexposition von Pflanzen wird die Entstehung eines nicht-fluoreszierenden Chlorophyllderivates diskutiert (Kändler und Ulrich 1963), und H. Frank und W. Frank (1985) entdeckten bei Pigmentanalysen von geschädigten Fichtennadeln ein Chlorophyllderivat, dessen Entstehung sie der Einwirkung chlorierter Kohlenwasserstoffe auf Chlorophyll zuschreiben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Reaktionen der Gase SO_2 , NO_x , der Kombination beider Gase sowie von Ozon mit den Photosynthesepigmenten untersucht.

Vorarbeiten von Haslberger (1986) ergaben bei der SO_2 -Begasung von reinem und protein-gebundenem Chlorophyll a Hinweise auf ein schadstoffspezifisches Abbauprodukt, wohingegen über die Reaktionen von NO_x , von SO_2/NO_x und auch von Ozon mit den Photosynthesepigmenten bisher noch wenig bekannt war. Diese sollten im Rahmen der hier beschriebenen

Experimente eingehend erforscht werden.

Zunächst wurde das quantitative und qualitative Verhalten des reinen Pigments gegenüber den obengenannten Gasen getestet, sodann betrachtete man das Pigment im Proteinverband, und zuletzt wurden Begasungsversuche an der intakten Pflanze vorgenommen. Als Modell wurde 10 - 14 Tage alter Hafer gewählt, da dessen Anzucht und Wachstum schnell und unproblematisch erfolgt.

Bei allen Experimenten fand ferner der Faktor Licht in Verbindung mit Schadgasen Berücksichtigung, da, wie bereits angedeutet, beim Zusammenwirken beider Komponenten photooxidative Pigmentschäden diskutiert werden. Vor allem Gasgemischen wird eine destruktive Wirkung zugesprochen, da sie unter Lichteinfluß reaktive Sekundärprodukte bilden. So bildet NO_x unter diesen Bedingungen PAN (Peroxyacetylnitrat), während Ozon sich mit Kohlenwasserstoffen zu Peroxiden umsetzen kann (Smidt 1978, Mohr 1983).

Das Verhalten der Carotinoide gegenüber Schadgasen wurde ebenfalls untersucht. Dies war insofern von Bedeutung, als ihnen bekanntlich eine Schutzfunktion gegenüber Licht- und Sauerstoffschäden zugesprochen wird (Gut et al. 1987, Krinski 1966) und sie daher möglicherweise auch eine schützende Wirkung gegenüber Schadgasen haben.

Auch hier wurden die Experimente zunächst mit reinem β -Carotin durchgeführt, bevor Thylakoide und Pflanzen zum Einsatz kamen.

In Thylakoiden und Pflanzen wurde auch die Stabilität der Xanthophylle gegenüber Gasen berücksichtigt.

Anzumerken ist in diesem Zusammenhang, daß sämtliche Versuche mit Carotinoiden nur im Licht durchgeführt wurden, da dessen Einfluß, wie bereits erwähnt, besonders hier zum Tragen kommt.

Von Interesse war ferner die Frage, ob die bei einer Schadgasimmission festgestellten quantitativen Änderungen im

Pigmenthaushalt mit einer verfrühten Seneszenz gleichgesetzt werden können, da das Waldsterben von einigen Autoren als ein vorzeitig einsetzender Alterungsprozess interpretiert wird (Schütt 1986, Mohr 1984).

Hierzu betrachtete man die Auswirkungen einer Stickoxidbegasung auf die Änderungen im Pigmenthaushalt während der Seneszenz. Dies geschah in Anlehnung an die bereits bekannte Tatsache, daß besonders stickstoffhaltige Verbindungen wie Nitrat und Ammonium eine Veränderung der Blattalterung hervorrufen (Wakhloo 1986).

Die Beeinflussung der Chlorophyll- und Carotinoidbiosynthese durch Schadgase wurde mittels quantitativer Pigmentanalysen etiolierter Haferpflanzen getestet.

Diese Untersuchungen wurden im Vergleich mit dem Einfluß von 2, 2'-Bispyridin vorgenommen. Durchgeführte Versuchsserien mit verschiedenen potentiellen Herbiziden zeigten, daß insbesondere 2, 2'-Bispyridin bei etioliertem Hafer unter Lichteinfluß starke Pigmentausbleichungen hervorruft, was darauf schließen läßt, daß mit diesem Reagenz eine Beeinflussung der Chlorophyllbiosynthese stattfindet.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde jedoch die mögliche Wirkungsweise dieser Verbindung nur kurz angesprochen, vielmehr sollte aufgezeigt werden, ob sich Gemeinsamkeiten in den Auswirkungen von Schadgasen und 2, 2'-Bispyridin finden lassen.

Die aus diesen Experimenten gewonnenen Ergebnisse ließen jedoch alsbald erkennen, daß eine chemische Reaktion zwischen Schadgasen und Pigmenten erst bei extrem hohen Gaskonzentrationen auftritt. Anhand von Freilanduntersuchungen sollte daher festgestellt werden, ob die Gaskonzentrationen, die in der Umwelt herrschen, ausreichen, um auf indirektem Wege Pigmentveränderungen hervorzurufen.

Vergleichbare Untersuchungen wurden bereits von Gowin und Goral (1977) durchgeführt. Die Autoren stellten bei Fichten

aus SO_2 -belasteten Industriegebieten neben einer Chlorophyllabnahme eine Zunahme an Pheophytin fest.

Auch v. d. Ropp (1985) führte umfangreiche Pigmentanalysen an erkrankten Fichten aus dem bayerischen Wald durch, und fand einen leicht verminderten Chlorophyll b-Gehalt. Von den Carotinoiden zeigte lediglich Antheraxanthin im Vergleich zu gesunden Pflanzen quantitative Differenzen. Der Gehalt dieses Pigments war in Nadeln erkrankter Bäume im Vergleich zu Kontrollpflanzen leicht erhöht.

Da Stickoxide aufgrund ihres hohen Aufkommens (vergl. Abb. 3) als Schadgase eine relativ große Rolle spielen, wurden für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen 2 Linden aus unterschiedlich stark NO_x -belasteten Zonen des Münchener Stadtgebietes ausgewählt. Ihre Pigmente wurden über einen mehrmonatigen Zeitraum auf qualitative und quantitative Veränderungen untersucht.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungsmittel

NaNO_2 , NaHSO_3 : purum, Fluka

Puderzucker: Südzucker

Kartoffelstärke: Brügg

Phosphorsäure (95-98%), Schwefelsäure (98-99%): Baker

Dioxan, p.a.: Rathburn

Triton X-100: Roth

Aluminiumoxid: Typ W 200, Aktivität Super I, Woelm Pharma

DE-52, Anionentauschermaterial: Whatman

Linolensäure: Sigma

Sämtliche Lösungsmittel wurden destilliert oder p.a. verwendet.

Darstellung von peroxidfreiem Ether und Dioxan:

Technischer Ether sowie Dioxan p.a. wurden über eine Säule mit basischem Aluminiumoxid gereinigt.

2.2 Geräte

Photometer: HP Diode Array Spektralphotometer, für
Pigmentlösungen
DB-GT Grating Spectrometer für
Thylakoidsuspensionen

Zentrifuge: Kühlzentrifuge G 50 K, Fa. WKF

HPLC:

Pumpen: Fa. Waters, Königstein, Modell 6000 A,
0 - 6000 psi

Gradientenmischer: Fa. Waters, Königstein, Modell 660 A

Fluoreszenzdetektor: Solvent Programmer Fluorescencdetektor,
Kratos

Schoeffel Instruments, FS 950

Absorptionsdetektor: Fluoromat Absorptionsdetektor Latek,
Heidelberg, Spektrometer II
Fluoreszenzlampe: Camay Typ TL 900, 252 und 350 nm
Photoblitzzgerät: Metz Mecablitz 45 CT 1, eingestellt auf
maximale Helligkeit

2.3 HPLC-Systeme

System 1: Für Chlorophylle

(nach Mantoura und Llewellyn 1983)

Methanol : H₂O : P = 96 : 2 : 2

Aceton 100%

P = 1.5 g Tetrabutylammoniumacetat + 7.5 g
Ammoniumacetat in 100 ml Wasser

Gradient 11: nicht linear, 0 - 70% Aceton in 20 min.
für Pflanzenextrakte und Thylakoide

Gradient 6: linear, 0 - 70% (B) in 20 min. für reine
Chlorophylle

Säule: RP 18 (25 x 0.5 cm), mit Vorsäule

System 2: Für Pflanzenextrakte

Methanol : H₂O = 91 : 9

Aceton 100%

Gradient 6: linear, 0 - 70% Aceton in 20 min.

Säule: RP 18 (25 x 0.5 cm), mit Vorsäule

Detektion: Chlorophylle: 656 nm

Carotinoide: 430 nm

2.4 Analytische Dünnschichtchromatographie

Zum Einsatz kamen folgende Fertigplatten der Firma Merck im Format 10 x 10 cm:

PR 8, HPTLC, 13725, mit Fluoreszenzindikator F 254 S
Kieselgel 60, HPTLC.

Die Fluoreszenz wurde mit einer UV-Lampe bei 254 und 350 nm betrachtet.

System 3: Methanol : Aceton : H₂O = 30 : 20 : 1
Platten: RP 8, HPTLC

System 4: CCl₄ : Aceton = 88 : 12
Platten: Kieselgel 60, HPTLC

2.5 Herstellung der Pigmentlösungen

2.5.1 Chlorophyll a

Das Pigment wurde in wenig Ether aufgenommen und in 0.1 M Phosphatpuffer gegeben, der 0.1% Triton enthielt, sodann rührte man die Lösung zur Solubilisierung 2 - 3 Stunden. Danach sollte die Extinktion bei 669 nm ungefähr 1 betragen.

2.5.2 β -Carotin

Aufgrund der schlechten Löslichkeit von β -Carotin in 0.1% Triton-Phosphatpuffer wurden die Begasungsexperimente, sofern nicht anders angegeben, in einem Gemisch aus Methanol : H₂O : Aceton = 155 : 15 : 40 durchgeführt.

2.6 Sicherheitsvorkehrungen

Sämtliche Photosynthesepigmente sind im nicht protein-gebundenen Zustand mehr oder weniger empfindlich gegen Licht, Sauerstoff, Säuren, alkoholhaltige Lösungsmittel und Wärme. Daher wurde immer in einem abgedunkelten Labor oder bei grünem Sicherheitslicht gearbeitet. Allzulange Sauerstoffeinwirkung wurde vermieden, indem man die Pigmente so weit als möglich unter Stickstoff handhabte. Ferner wurden Pigmentextraktionen immer mit kalten Lösungsmitteln durchgeführt.

Zur Aufbewahrung wurden reine Pigmente sowie Pflanzenextrakte in einem 1 ml-Präparateglas mit Stickstoff zur Trockene eingeeengt, sofort verschlossen und bei -18°C gelagert.

2.7 Isolierung von Chlorophyllen

2.7.1 Chlorophyll a

Chlorophyll a wurde aus der chlorophyll-b-freien Alge *Spirulina geitleri* gewonnen (Schmidt 1985).

Zunächst mixte man ca. 5 g sprühgetrocknete Algen in 100 ml 80%-igem Aceton im Waring Blender und saugte den so gewonnenen Zellbrei über einen Büchnertrichter ab. Diese Prozedur wurde noch 2 mal wiederholt.

Der in Aceton gelöste Pigmentextrakt wurde sodann in einem 1 l Scheidetrichter durch Waschen mit bidest. Wasser in Ether übergeführt und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeeengt. Im Anschluß daran erfolgte eine Dioxanfällung (Iriyama und Shiraki 1979). Zu diesem Zweck nahm man die feste Rohfraktion in 130 ml Aceton auf, versetzte sie mit 18 ml Dioxan und tropfte sehr langsam (30 Tropfen pro min.) bidestilliertes Wasser unter Kühlen und Rühren zu, bis die Lösung eine deutliche Trübung aufwies. Nach einstündiger Inkubation im Eisbad wurde der entstandene Niederschlag 10

min. lang bei 10000 g zentrifugiert und der Überstand dann abdekantiert.

Die weitere Aufreinigung erfolgte über eine Zuckersäule: Puderzucker wurde zunächst mit 3% Stärke versetzt, gesiebt und 18 h bei 60°C aktiviert. Nach Abkühlen dieser Zucker-Stärke-Mischung im Exsikkator über Blaugel wurde damit eine Säule von 4 cm Durchmesser bis zu einer Höhe von 30 cm gestopft. Der bei der Dioxanfällung angefallene Niederschlag wurde nun in möglichst wenig Ether (ca. 1 ml) aufgenommen. Hierzu fügte man 9 ml Petrolether (40 - 60°C), so daß man eine 10%-ige Lösung von Ether in Petrolether erhielt, und gab den Pigmentextrakt auf die Säule auf.

Die Bandenelution wurde mit den angegebenen Elutionsmitteln in folgender Reihenfolge vorgenommen:

β-Carotin	Petrolether (PE)
Pheophytin	PE : Aceton 99.5 : 0.5
Chlorophyll a	PE : Aceton 99 : 1 bis 97 : 3

(McFeeters et al. 1971)

Die Chlorophyllfraktion wurde zuerst mit 80%, sodann mit 50% Methanol und zum Schluß mit Wasser im Scheidetrichter gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingeengt und bei - 18°C gelagert.

2.7.2 Chlorophyll b

Chlorophyll b wurde aus Spinat gewonnen, den man entweder käuflich erwarb oder im Gewächshaus des botanischen Instituts bei ca. 23°C anzog.

Zur Pigmentisolierung wurde dieselbe Methode wie für Chlorophyll a angewandt. Die Elution von der Zuckersäule erfolgte mit einer Mischung von PE : Aceton = 97 : 3 bis 95 : 5.

2.8 Gewinnung und Reinigung der Thylakoide

Zum Einsatz kamen Thylakoide aus Erbsen. Sie fielen bei der Isolierung von Chloroplasten während der Gradientenzentrifugation im Überstand an. Die Thylakoidfraktion wurde zunächst in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.5 aufgenommen und bei 5000 g 1 min. lang zentrifugiert. Diesen Vorgang wiederholte man noch 3 mal.

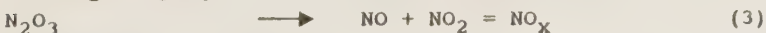
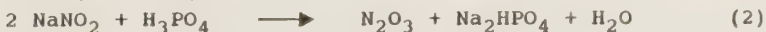
2.9 Aufbereitung der Thylakoide

Für die Begasungsexperimente suspendierte man die Thylakoide unter leichtem Rühren und Kühlen ca. 30 min. in 0.1 M Phosphatpuffer ohne Tritonzusatz und stellte die Extinktion bei 680 nm auf 3 - 4 ein.

2.10 Herstellung der Gase SO_2 , NO_x und Ozon

2.10.1 SO_2 und NO_x

Die Gase wurden aus den Natriumsalzen nach den folgenden Reaktionsgleichungen mit konzentrierter Schwefel- bzw. Phosphorsäure gewonnen:



Das entsprechende Salz wurde in einer Kristallisierschale (Durchmesser 4 cm) eingewogen oder als Aliquot einer wässrigen Stammlösung einpipettiert und dann mit einem Heißluftföhn eingetrocknet. Anschließend erfolgt die Umsetzung nach Gleichung (1) oder (2) durch Zugabe von 1 ml

der entsprechenden Säure. Zur quantitativen Austreibung des Gases aus der Säurelösung wurde diese gerührt.

2.10.2 Ozon

Ozon wurde mittels eines Ozonisators durch stille elektrische Entladung dargestellt (Beroza und Bierl 1967). Der Sauerstoffpartialdruck betrug bei allen Experimenten 1 atm. Das Gas wurde direkt in die Pigmentlösung eingeleitet, im Falle von Pflanzenbegasungen wurde der Begasungsraum über eine Gummidichtung damit beschickt.

2.11 Umrechnung der Gasmengen in ppm

2.11.1 SO_2 , NO_x

Molgewicht NaNO_2 : 69.95

Molgewicht NaHSO_3 : 104.04

Beispiel:

eingewogene Salzmenge: 10 mg NaNO_2 = 0.14 mM

22.4 ml = 1 mM

3.24 ml = 0.14 mM

Exsikkatorvolumen : 6800 ml (Begasungsraum)

$3.24/6800 = 0.47 \times 10^{-3}$

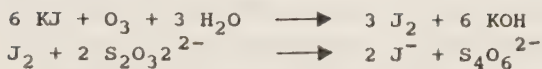
$0.47 \times 10^{-3} \times 10^6 = 470 \text{ ppm}$

2.11.2 Ozon

Zur Umrechnung der Einleitungszeit von min. auf ppm wurde folgender Versuch durchgeführt:

In einem graduierten Zentrifugenglas (15 ml) mit 12 ml einer 0.1 N KJ- Lösung leitete man bei gleichbleibendem Sauerstoffpartialdruck (1 atm) 5 bzw. 10 min. lang Ozon ein. Das

dabei entstehende Jod wurde mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ wieder zurücktitriert:



Verbrauch an 0.1 N $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ in μl :

5 min. O_3 200 150 (D = 175)

10 min. O_3 510 420 (D = 475)

Berechnung: 175 μl 0.1 N $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ = 0.0175 mM 0.1 N KJ

0.0175 mM O_3 = 0.035 mM O_3

5 min. Ozon: ca. 30 ppm

10 min. Ozon ca. 60 - 80 ppm

2.12 Pflanzenmaterial

2.12.1 Anzucht von Hafer (*Avena sativa*)

2.12.1.1 Grüner Hafer

Haferkörner (Bayr. Saat und Futtermittel) wurden in 30 x 20 cm großen Saatschalen aus Plastik auf Vermiculit angesät, mit Leitungswasser ohne Düngezusatz gegossen und im Gewächshaus bei 20 - 25°C 10 - 14 Tage wachsen lassen.

2.12.1.2 Etiolierter Hafer

In einer Kristallisierschale von 7 cm Durchmesser, die mit Filterpapier ausgelegt war, wurden 20 - 25 entspelzte Haferkörner mit 8 ml Leitungswasser ohne Düngezusatz versetzt. Die Schalen stellte man dann in 20 x 20 x 10 cm große Plastikgefäße, die ca. 1 cm hoch mit Wasser gefüllt waren und deckte diese mit einem Deckel luftdurchlässig ab. Die Behälter stellte man nun zur Keimung 50 bzw. 72 h in einen 26°C warmen Brutschrank.

2.12.2 Tamariskenmoos (*Thuidium tamariscinum*)

Die Moosproben stammten von einem Versuchsgelände des Instituts für Bodenkunde der Universität München (Höglwald) und teilten sich in folgende Kategorien auf:

- B 1: Auf dem Versuchsgelände bereits sauer beregnet, u. zw. mit folgenden Konzentrationen H_2SO_4 : 3 k Mol/ha, pH 2.8
- B 2: Sauer beregnet (s. B1), zusätzliche Düngung mit CaCO_3 (55%), MgCO_3 (40%): 4×10^{-3} k Mol/ha
- C 1: Keine Düngung, Beregnung mit normalem Wasser

2.12.3 Fichten (*Picea abies*)

Die Fichtenproben stammten entweder aus dem Bayerischen Wald/Dreisesselgebiet oder aus dem Botanischen Garten in München. Für die Begasungsexperimente setzte man nur die jüngsten Triebe ein. Außerdem wurden noch einjährige Fichtenbäumchen (5 - 10 cm hoch) eingesetzt, die man am Stadtrand von München im Perlacher Forst sammelte, in Blumentöpfe einpflanzte und so zur Weiterverarbeitung ins Labor transportierte.

2.12.4 Linden (*Tilia platiphyllos*)

Als Freilandpflanzen wählte man Lindenbäume der Standorte Effnerplatz und Hirschgarten im Stadtgebiet von München.

2.13 Pigmentextraktionen

2.13.1 Aus grünen Pflanzen

Die Extraktion erfolgte in etwas modifizierter Form nach Senger (pers. Mitteilung). 200 mg Pflanzenmaterial wurden mit der Schere kleingeschnitten und in einem eisgekühlten Mörser mit Seesand sowie einer Spatelspitze NaHCO_3 schnell zerrieben. Nach Zugabe eines Aceton/Hexangemisches im Verhältnis 3:1 wurde zentrifugiert. Das Pellet extrahierte man noch einmal in derselben Weise und ein drittes Mal mit reinem Aceton. Nach Vereinigung der 3 Extrakte (ca. 15 ml) wurden diese am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedunstet, in Ether aufgenommen, über Watte filtriert und mit Stickstoff eingeblasen.

2.13.2 Aus etioliertem Hafer

Die Pflanzen wurden am Bestockungsknoten in Keimblätter und Hypokotyl getrennt. Zur weiteren Aufarbeitung verwendete man nur die Keimblätter.

Zunächst wurde mindestens 0.5 g Pflanzenmaterial in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff eingefroren, fein pulverisiert und mit 3 - 5 ml kaltem Aceton sowie 50 µl 1 N Ammoniaklösung versetzt. Dieses Homogenat wurde ca. 1 min. lang zentrifugiert. Das so erhaltene Pellet wurde noch 2 mal mit 100% sowie 1 x mit 80% Aceton nachgespült. Die vereinigten Überstände extrahierte man in einem graduierten 15 ml Zentrifugenglas mit 2 - 3 ml Chloroform. Falls die Phasentrennung nicht sofort erfolgte, konnte dies durch Zugabe einiger Tropfen bidest. Wasser erreicht werden. Die Chloroformphase wurde nun mit 5 Tropfen 1 N HCl versetzt, gut gemischt und 10 min. stehengelassen. Anschließend wurde saurefrei gewaschen und mit Stickstoff zur Trockene

eingeeengt, wobei zurückbleibende Wasserspuren durch Zugabe von Aceton als Azeotrop entfernt werden konnten. Der Feststoff wurde bei -18°C gelagert.

2.14 Ermittlung von absoluten Pigmentgehalten durch HPLC

Die Flächen der Absorptionspeaks dienten als quantitatives Maß für den Pigmentgehalt. Sie wurden als Produkt von Halbwertsbreite und -höhe bestimmt. Zur Umrechnung der Peakflächen in μg eichte man diese mittels definierter Mengen der entsprechenden Standardsubstanzen, die zuvor photometrisch bestimmt worden waren. Bei allen quantitativen Pigmentanalysen wurden die einzelnen Peaks mit den in Tabelle 1 angegebenen Verstärkungen aufgenommen.

Tabelle 1: Spezifische Extinktionskoeffizienten ϵ , Schreiberverstärkung V sowie Pigmentmenge M in $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Pigment (Lösungsmittel)	nm / ϵ	V	M
Chlorophyll a ¹⁾ (Ether)	660 / 101	1.28	9.200
Chlorophyll b ¹⁾ (Ether)	643 / 60.5	0.32	3.280
β -Carotin ²⁾ (Chloroform)	464 / 2200	0.32	0.910
Lutein- Epoxid ²⁾ (Ethanol)	440 / 2400	0.02	0.0299
Antheraxanthin ²⁾ (Ethanol)	446 / 235	0.02	0.0314
Neoxanthin ²⁾ (Ethanol)	438 / 2270	0.16	0.194
Violaxanthin ²⁾ (Ethanol)	441 / 2500	0.16	0.210

1) French (1960)

2) Hager und Meyer-Bertenrath (1966)

2.15 Quantitative Pigmentbestimmungen in etioliertem Hafer

Die Konzentrationsbestimmungen sämtlicher Pigmente in etioliertem Hafer fanden spektralphotometrisch bei den in Tabelle 2 angegebenen Wellenlängen statt. Zur Berechnung des Gehaltes wurden zunächst die molaren Extinktionskoeffizienten herangezogen, anschließend rechnet man in $\mu\text{g um}$.

Tabelle 2: molare Extinktionskoeffizienten¹⁾ der Pigmente in etioliertem Hafer, Lösungsmittel: Ether

Pigment	nm / E
Pheophytin a Pheophorbid a	667 / 55.5
Protopheophorbid a	565 / 22.0
Protochlorophyll a Protochlorophyllid a	623 / 35.6
Chlorophyll a Chlorophyllid a	662 / 90.2
Carotinoidsumme	450 / 2500

- 1) Die Extinktionswerte für Protochlorophyll und Protopheophytin gelten auch für Protochlorophyllid und Protopheophorbid (French 1960). Für Carotinoide ist der spezifische Extinktionskoeffizient einer einprozentigen Lösung angegeben (Davies 1976).

2.16 Herkunft, Gewinnung und Identifikation von Eichsubstanzen zur quantitativen Pigmentbestimmung mittels HPLC

2.16.1 Chlorophyll a, Chlorophyll b und β -Carotin

Chlorophyll a: aus *Spirulina geitleri* nach 2.7.1

Chlorophyll b: aus Spinat nach 2.7.2

β -Carotin: käuflich erworben bei Sigma

2.16.2 Xanthophylle

Die Xanthophylle wurden aus einem Pigmentextrakt von Hafer durch dünnenschichtchromatographische Auftrennung (System 3) gewonnen. Die einzelnen Banden wurden ausgekratzt und das Pigment mit Ether eluiert. Anschließend wurde die Lösung zur Trockene eingengt und der Rückstand zur Aufnahme eines Absorptionsspektrums von 350 bis 500 nm in Ethanol gelöst. Die Identifizierung erfolgte mittels der Daten, die in der Literatur angegeben waren (Hager und Meyer-Bertenrath 1966) sowie in Anlehnung an die von Britton (pers. Mitteilung) angegebene Elutionsreihenfolge mit einem HPLC-System, das dem hier verwendeten System 2 in seiner Polarität entsprach.

3 Experimenteller Teil

3.1 Quantitative Pigmentanalysen

3.1.1 Begasung von Pigmentlösungen, Thylakoidsuspensionen und Pflanzen im Licht und im Dunkeln

Sämtliche Begasungsexperimente wurden in einem Exsikkator mit 6.8 l Volumen durchgeführt.

Man stellte eine Kristallisierschale mit dem Salz, aus dem das Gas nach Vorschrift 2.10 durch Säurezugabe entwickelt wurde sowie die zu begasende Pigmentlösung, Thylakoidsuspension oder Pflanze in den Expositonsraum und verschloß diesen sofort nach dem Beginn der Gasentwicklung durch Aufsetzen des Deckels.

Bei der Mischbegasung mit SO_2 und NO_x wurde analog verfahren, jedoch befanden sich die Salze hier in getrennten Kristallisierschalen.

Es erfolgte nun eine 18- bzw. 2-stündige Gasexposition im Dunkeln bzw. bei 1000 Lux (Tageslicht).

Für die Ozonbegasung wurde das nach 2.10.2 entwickelte Gas zunächst 5 - bzw. 10 min. direkt in die Chlorophylllösung eingeleitet. Im Anschluß daran erfolgte eine 2-stündige Inkubation im Licht oder unter Lichtausschluß im Exsikkator. Zur Ozonexposition von Pflanzen leitete man das Gas über eine Gummidichtung ebenfalls 5 bzw. 10 min lang in den Expositionsraum und inkubierte anschließend 2 h lang bei 1000 Lux.

Die Gasmengen wurden, wie in 2.11 beschrieben, in ppm umgerechnet.

3.1.1.1 Begasung von Pigmentlösungen

Man begaste 5 ml einer nach Vorschrift 2.5 hergestellten Chlorophylllösung unter Rühren in einem 10 ml-Becherglas. Vor und nach der Reaktion wurde die Extinktionsänderung von Chlorophyll bei 669 nm gemessen.

β -Carotin behandelte man analog, jedoch wurde hier die Absorption bei 452 nm zugrundegelegt.

Bei sämtlichen Experimenten wurde ferner der Pigmentgehalt einer unbegasten Kontrolle nach 18- bzw. 2-stündigem Rühren bei den entsprechenden Lichtverhältnissen bestimmt.

3.1.1.2 Begasung von Thylakoidsuspensionen

Zur Präparation der Thylakoide für die Begasungsexperimente ging man zunächst wie in 2.8 und 2.9 geschildert vor. Anschließend begaste man jeweils 5 ml Suspension in einem 10 ml-Becherglas unter Rühren. Nach beendeter Reaktion wurde die Extinktionsänderung bei 680 nm gemessen und hieraus die prozentuale Chlorophyllabnahme bestimmt.

3.1.1.3 Begasung von Pflanzen

Für die Begasungsexperimente wurden die Pflanzen in flache Glasschalen umgetopft und mit den Wurzeln begast.

3.1.2 Pigmentextraktion aus Thylakoiden und Pflanzen sowie quantitative Pigmentbestimmung

3.1.2.1 Aus Pflanzen

Die Extraktionsmethode bzw. die quantitative Bestimmung der Pigmente ist in 2.13 bzw. 2.14 beschrieben.

Für die Extraktion von Hafer verwendete man Material aus der oberen Blatthälfte.

3.1.2.2 Aus Thylakoiden

Nach der Gasexposition wurde die wässrige Thylakoidsuspension unter Eiskühlung gepottert. Die nun folgende Pigmentextraktion wurde nach Vorschrift 4.2 durchgeführt.

Die Ermittlung der Pigmentgehalte erfolgte nach der in Kapitel 2.14 angegebenen Methode.

3.1.3 Versuche zur Seneszenz

3.1.3.1 Induktion der Seneszenz

Die Einleitung der Seneszenz wurde in Anlehnung an die von Maunders et al. (1983) sowie nach Schmidt (1985) durch mehrtägiges Dunkelstellen von 10-14 Tage altem grünen Hafer bei 23°C vorgenommen.

Zum Einsatz kamen dabei unbegastetes Material, wie auch Pflanzen, die vor der Dunkelinkubation zunächst 2 h lang mit 200 ppm NO_x bei 1000 Lux begast wurden.

3.1.3.2 Extraktion und quantitative Auswertung der Pigmente

Von den dunkelgestellten Pflanzen wurden nach 2, 4 und 7 Tagen Proben zur Pigmentextraktion entnommen (vergl. Kap. 2.13.1). Die quantitative Auswertung wurde mittels HPLC durchgeführt und ist unter 2.14 beschrieben.

3.1.4 Versuche zur Chlorophyllbiosynthese

3.1.4.1 Belichtung von etioliertem Hafer nach NO_x-Begasung

Der Hafer wurde nach 2.12.1.2 angezogen und nach 50 Stunden mit 200 ppm NO_x 2 h lang im Dunkeln begast. Daran schloß sich eine 4- stündige Belichtung bei 5000 Lux an.

Die Pigmentextraktion erfolgte wie in 2.13.2 beschrieben. Die Konzentrationsbestimmung der Tetrapyrrole Protopheophorbid und Pheophytin ist in 2.15 geschildert.

3.1.4.2 Belichtung von 2, 2'-bispyridin-behandeltem Hafer

Nach einer Keimzeit von 50 bzw. 72 Stunden (vergl. 2.12.1.2) wurde an Stelle der Begasung eine Behandlung mit 2, 2'-Bispyridin durchgeführt. Zu diesem Zweck saugte man das Wasser in den Kristallisierschalen mit einer Wasserstrahlpumpe ab, ersetzte es durch 8 ml einer 1 mM 2, 2'-Bispyridinlösung und inkubierte 17 h lang bei 26°C. Das weitere Vorgehen ist in 3.4.1 beschrieben.

3.1.4.3 Blitzbelichtung von etioliertem, 2, 2'-bispyridin-behandeltem Hafer

50 bzw. 72 h alter Hafer wurde unter Lichtausschluß 17 h lang bei 26°C mit einer 1 mM 2, 2'-Bispyridinlösung inkubiert. Nun erfolgte die Belichtung mit einem Photoblitz und im Anschluß daran sofort die Aufarbeitung nach 2.13.2 sowie die quantitative Pigmentbestimmung.

Die Photoumwandlung (U) wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$U = c \text{ (Phe)} / [c \text{ (Phe)} + c \text{ (Protopheid)}]$$

3.1.4.4 Bestimmung der Veresterungsrate nach Schadgaseinwirkung

50 Stunden alter Hafer wurde 17 h lang im Dunkeln bei 26°C begast. Dabei kamen folgende Gaskonzentrationen zum Einsatz:

	SO ₂ [ppm]	NO _x [ppm]
Versuch 1	5	-
Versuch 2	-	5
Versuch 3	2	2

Anschließend wurden die Pflanzen mit einem Lichtblitz belichtet und noch 1 h bei 26°C im Dunkeln inkubiert. Sodann extrahierte man die Pigmente wie in 2.13.2 beschrieben, jedoch ohne anzusäuern.

Der so erhaltene Gesamtpigmentextrakt wurde zunächst in einem Nisselröhrchen in 1 ml peroxidfreien Ether gelöst und die Extinktion bei 623 sowie 662 nm gemessen.

Zur Trennung von veresterten und nicht veresterten Tetrapyrrolen gab man nun die etherische Pigmentlösung auf

eine 5 x 0.7 cm große Säule, die mit dem Anionentauschermaterial DE 52 (Whatman) gefüllt war, eluierte Chlorophyll a mit Ether und bestimmte dessen Extinktion bei 662 nm.

Die Ermittlung der Konzentration von Chlorophyll a sowie des Gesamtpigmentgehaltes $S = (\text{Chl a} + \text{Chlid a})$ erfolgte mit den in Tabelle 2 (2.15) angegebenen Extinktionskoeffizienten. Den Chlorophyllidgehalt ermittelte man aus diesen Daten durch Differenzbildung.

3.1.4.5 Unter Einwirkung von 2, 2'-Bispyridin

50 bzw. 72 h alter Hafer wurde unter Lichtausschluß bei 26°C 17 h lang mit 1 mM 2, 2'-Bispyridin inkubiert und dann, wie in 3.1.4.1. geschildert, weiterbehandelt.

3.1.5 Carotinoidanalysen von schadgas- sowie von 2, 2'-bispyridin-behandeltem Hafer

Parallel zu den Pigmentanalysen, die bei den Versuchen zur Chlorophyllbiosynthese durchgeführt wurden, ermittelte man auch den Gesamtcarotinoidgehalt der begasten und der herbizidbehandelten Pflanzen. Die Bestimmung erfolgte spektralphotometrisch, wobei der in Tabelle 2 (vergl. 2.15) angegebene Extinktionskoeffizient verwendet wurde.

3.1.6 Statistik

Versuche, bei denen Pflanzen zum Einsatz kamen, wurden insgesamt 3 mal durchgeführt. Die angegebenen Daten stellen einen Mittelwert aus den beiden Werten dar, die am wenigsten voneinander abwichen. Die Differenzen lagen in der Regel zwischen 15% und 25%.

Die Experimente mit isoliertem Pigment und mit Thylakoiden wurden, sofern nicht anders angegeben, nur einmal durchgeführt.

3.2 Qualitative Pigmentanalysen

3.2.1 Durchführung der Begasungsversuche

Die Begasung der reinen Pigmente, Thylakoidsuspensionen und Pflanzen wurde bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben. Zum Einsatz kamen jeweils 5 ml des in Triton gelösten Pigments. Vor der Reaktion stellte man die Extinktion bei 669 nm auf 1.0 - 1.2 ein (ca. 11-14 $\mu\text{g/ml}$). Nach beendeter Reaktion wurde ein Spektrum von 350 - 800 nm aufgenommen. Zur weiteren Analyse der Produkte mittels Dünnschichtchromatographie und HPLC überführte man anschließend die Pigmente in Ether.

3.2.2 Überführung der Pigmente in Ether

Die wässrige Pigmentlösung wurde mit dem gleichen Volumen eines 1:1 Gemisches aus Ether und Aceton versetzt. Durch Zugabe von festem NaCl konnten die Reaktionsprodukte quantitativ in die organische Phase übergeführt werden. Nach dreimaligem Waschen mit wenig Wasser und Trocknen über Na_2SO_4 wurde die Etherlösung mit Stickstoff zur Trockene eingeeengt und bis zur weiteren Verwendung bei -18°C aufbewahrt.

3.2.3 Pheophytinisierung der Chlorophyllderivate X sowie Darstellung von Pheophytin aus Chlorophyll a

Eine wässrige Lösung von Chlorophyll a wurde zunächst mit NO_x begast. Dabei waren die Gaskonzentrationen so bemessen, daß eine quantitative Umsetzung von Chlorophyll zu den Produkten X möglich war (ca. 30 ppm). Anschließend wurde das Reaktionsgemisch, wie zuvor beschrieben, in Ether übergeführt.

Durch Zugabe von 3 - 5 Tropfen konzentrierter Ameisensäure schlug die Farbe der Pigmentlösung von Grün nach Graugrün um. Danach neutralisierte man die organische Phase mit einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung. Anschließend wurde noch 3 mal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und zur Trockene eingengt. Zur Darstellung von Phe a aus unbegastem Chl a ging man analog vor. Das Pigment wurde in 3 - 5 ml Ether aufgenommen und, wie oben beschrieben, mit Ameisensäure umgesetzt.

3.2.4 Darstellung von Pheophorbid a

Pheophorbid a wurde nach Fischer und Orth (1940) dargestellt. Zu diesem Zweck wurde Chlorophyll a in 3 - 5 ml Ether gelöst und mit einer 30%-igen etherischen HCl -Lösung versetzt, bis ein Farbumschlag von Grün nach Braungrün erfolgte. Man neutralisierte die Etherphase nun mit einer gesättigten NaHCO_3 -Lösung. Nach dreimaligem Waschen mit Wasser und Trocknen über Na_2SO_4 wurde die Lösung zur Trockene eingengt.

Die Abtrennung des ebenfalls entstehenden Pheophytins konnte mittels Dünnschichtchromatographie (System 3) erreicht werden. Die polarste Zone (R_f 0.75 - 0.80) wurde von der Glasplatte abgelöst und mit Ether gespült. Den Feststoff zentrifugierte man anschließend ab, überführte die

Flüssigkeit in ein frisches Reagenzglas und blies sie mit Stickstoff zur Trockene ein.

3.2.5 Phasentest nach Molisch (1896)

Eine etherische Pigmentlösung wurde unter Schütteln tropfenweise mit 30% KOH, gelöst in Methanol, versetzt, u. zw. so lange, bis eine Entfärbung der Etherphase bei gleichzeitiger Anfärbung der wässrigen Phase zu beobachten war.

3.2.6 Ermittlung der Schwellenwerte für das Auftreten schadstoffspezifischer Abbauprodukte

Die Schwellenwerte wurden nach der erstmaligen Detektion der Produkte mittels HPLC festgelegt.

3.3 Freilanduntersuchungen

3.3.1 Herkunft des Pflanzenmaterials und Standortbeschreibung

Als Untersuchungsobjekte wurden jeweils 1 Lindenbaum am Standort Hirschgarten und Effnerplatz gewählt. Für den Effnerplatz wurden im August 1987 vergleichsweise hohe Stickoxidkonzentrationen gemessen. Tabelle 3 gibt über die genauen Meßdaten Auskunft.

**Tabelle 3: Luftanalyse am Standort Effnerplatz in München
(Lufthygienischer Monatsbericht 8/87, Bayerisches
Landesamt für Umweltschutz)**

	Höchstwert		Mittelwert	
	mg/m ³	ppm	mg/m ³	ppm
NO	0.7580	0.242	0.1125	0.036
NO ₂	0.1790	0.057	0.0673	0.0215

Der für die Untersuchungen ausgewählte Baum stand an der Kreuzung Richard-Strauß-Straße/Bülowstraße und war somit der NO_x-Immission unmittelbar ausgesetzt. Im Gegensatz hierzu stammte das Untersuchungsobjekt des Standortes Hirschgarten aus einer parkartigen Umgebung. Da die nächste starkbefahrene Straße in ca. 500 m Entfernung lag, ging man davon aus, daß die NO_x-Belastung hier im Vergleich zum Effnerplatz geringer war. Genaue Meßdaten lagen jedoch nicht vor.

Von Juni bis September 1987 wurden im Abstand von ca. 14 Tagen jeweils von beiden Standorten Proben entnommen. Das Pflanzenmaterial wurde zwischen 7 und 9 Uhr morgens gesammelt, möglichst schnell ins Labor transportiert und dort sofort extrahiert.

3.3.2 Pigmentextraktion und Ermittlung des absoluten Pigmentgehaltes

Die Extraktion der Pigmente erfolgte nach 2.13.1. Pro Analyse wurden jeweils 200 mg frische Blätter eingesetzt. Zur Bestimmung des absoluten Pigmentgehaltes ging man, wie unter 2.14 beschrieben, vor.

3.3.3 Statistische Berechnungen

Die ermittelten Pigmentgehalte entsprachen dem Durchschnitt aus 3 Einzelproben. Die relativen prozentualen Standardabweichungen sind in den Tabellen 4 und 5 angegeben. Eventuell auftretende quantitative Unterschiede zwischen den beiden Standorten wurden dann als signifikant betrachtet, wenn ihre prozentuale Abweichung zu den beiden Mittelwerten deutlich über den entsprechenden Standardabweichungen lag.

Tabelle 4: Relative prozentuale Standardabweichungen der mittleren Pigmentgehalte am Standort Effnerplatz

	7.6.	15.6.	1.7.	15.7.	4.8.	20.8.	1.9.	29.9.	15.10.	3.11.
Nea	6	10	6	4	32	30	19	16	65	43
Viol	13	17	4	8	30	17	25	32	62	21
LuE	8	22	11	6	55	23	18	25	69	33
Ant	11	7	2	10	7	30	47	25	22	48
Lu	10	11	2	3	33	32	14	17	19	19
Σ chl	2	12	5	7	30	12	10	17	71	68
Car	2	15	7	15	14	32	2	18	76	28

Tabelle 5: Relative prozentuale Standardabweichungen der mittleren Pigmentgehalte am Standort Hirschgarten

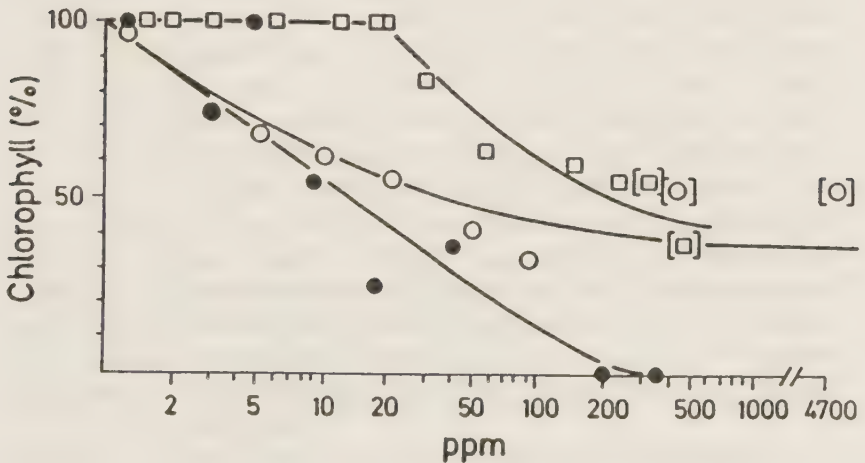
	7.6.	15.6.	1.7.	15.7.	4.8.	20.8.	1.9.	29.9.	15.10.	3.11.
Nea	17	15	20	8	13	6	4	11	64	27
Viol	11	16	16	29	21	26	10	18	55	19
LuE	66	41	23	31	54	39	33	76	54	12
Ant	11	18	31	44	27	12	11	2	12	19
Lu	23	22	20	12	18	12	7	12	21	18
Σ chl	18	13	16	40	25	8	6	4	70	60
Car	38	15	15	22	23	5	28	12	56	21

4 Ergebnisse

4.1 Quantitative Pigmentanalysen

4.1.1 Begasung unter Lichtausschluß

4.1.1.1 Begasung von freiem Chlorophyll a



(□ - □) : SO₂; (○ - ○) : NO_x; (● - ●) : (SO₂/NO_x)

Abbildung 5: Restchlorophyllgehalt in Prozent der Kontrolle nach 18-stündiger Dunkelbegasung von isoliertem Chlorophyll a in Phosphatpuffer/Triton mit NO_x, SO₂ sowie SO₂/NO_x.

Hierbei beträgt das Verhältnis SO₂ : NO_x = 0,6, aufgetragen sind die jeweiligen Mengen an NO_x. Die Versuchsreihe wurde einmal durchgeführt. Sind die Symbole in Klammern gesetzt, so bedeutet dies, daß bei der entsprechenden Gaskonzentration eine Pheophytinisierung des Pigments eintrat.

Abbildung 5 zeigt den Prozentsatz an noch vorhandenem Pigment nach der 18- stündigen Dunkelbegasung mit NO_x , SO_2 sowie deren Kombination.

Mit SO_2 trat ein Ausbleicheffekt erst ab 30 ppm auf, jedoch führten bereits 5 ppm NO_x zu einer signifikanten Chlorophyllabnahme. Zu beachten ist ferner, daß durch eine Erhöhung der Stickoxidkonzentration keine völlige Pigmentausbleichung erreicht werden konnte, sondern daß stattdessen eine Verschiebung der Absorptionsmaxima eintrat. Analoge Resultate ergaben sich bei einer Begasung mit SO_2 . Auch hier kam es zu einer Änderung der Lage der Absorptionsmaxima. Diese konnte jedoch erst ab einer Konzentration von 30 ppm beobachtet werden, während man mit NO_x bereits mit 5 ppm zu diesem Ergebnis gelangte.

Im Gegensatz hierzu wurde durch die Kombination beider Gase bei hohen Schadstoffdosen eine völlige Pigmentzerstörung beobachtet. Auch eine Verringerung der Belastungswerte hatte immer noch eine etwas höhere Ausbleichrate zur Folge als die Begasung mit den Einzelkomponenten. Das Mischungsverhältnis $\text{NO}_x:\text{SO}_2$ wurde bei allen Versuchen konstant bei 3:2 gehalten.

Ozon erwies sich gegenüber Chlorophyll a als relativ aggressiv. Bereits nach einer Einwirkungszeit von 2 h konnten mit 30 ppm dieses Gases Pigmentabnahmen um 15% festgestellt werden.

4.1.1.2 Begasung von thylakoid-gebundenem Chlorophyll

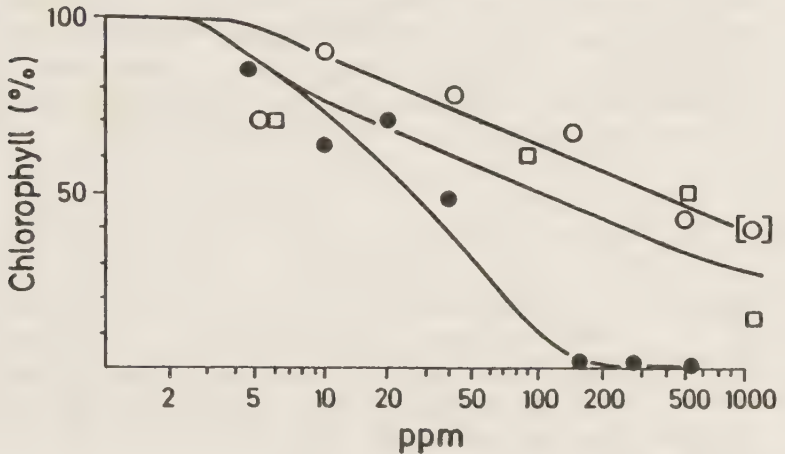


Abbildung 6: Restchlorophyllgehalt in Thylakoiden nach 18-stündiger Dunkelbegasung mit NO_x , SO_2 sowie mit SO_2/NO_x . Die Thylakoide waren in Phosphatpuffer aufgeschlämmt. Die Versuchsreihe wurde einmal durchgeführt. Symbole wie in Abbildung 5.

Das Verhalten von thylakoid-gebundenem Chlorophyll zeigte im Vergleich zum freien Pigment folgende Unterschiede (vergl. Abb. 6):

Während freies Chlorophyll auf NO_x empfindlicher reagierte als auf SO_2 , kam es in Thylakoiden durch die Einwirkung von SO_2 zu einer etwas größeren Ausbleichrate. Bei den höchsten Belastungswerten von SO_2 und NO_x war hier ebenso wie im freien Pigment eine einsetzende Peakverschiebung zu beobachten. Durchwegs analoge Verhältnisse zwischen freiem und gebundenem Pigment konnten bei der Mischbegasung beobachtet werden. Bei hohen Konzentrationen war jeweils eine völlige Ausbleichung festzustellen, die in etwa bei den

gleichen Schwellenwerten einsetzte.

Sowohl Thylakoide wie freies Chlorophyll wiesen bei der Mischbegasung größere Ausbleichraten auf, als bei der Einwirkung der Einzelkomponenten, jedoch wurde hier wenig Unterschied in der Ausbleichrate von protein-gebundenem und freiem Pigment gefunden.

4.1.1.3 Begasung von Hafer

Tabelle 6: Chlorophyllgehalte in mg/g Fg nach 18-stündiger Dunkelbegasung von Hafer mit SO_2 , NO_x sowie mit deren Kombination (Gaskonzentrationen in ppm)
Die Daten stellen einen Mittelwert aus 2 Versuchen dar (vergl. 3.1.6).

SO_2	NO_x	Chl a	%	Chl b	%	Chl a/Chl b
-	-	2.02	100	0.74	100	2.7
300	-	1.63	81	0.63	85	2.6
-	700	2.32	115	0.73	98	3.2
300	470	1.73	86	0.62	84	2.8

Nach beendeter Exposition zeigten die Haferpflanzen kaum optische Schäden. Lediglich bei 700 ppm NO_x traten stellenweise braune Spitzen auf. Die Mischbegasung rief nur vereinzelt ein Welken und Umknicken der Blätter hervor. Aus Tabelle 6 ist zu entnehmen, daß selbst mit hohen Belastungswerten nur eine geringfügige Ausbleichung der Photosynthesepigmente zu erreichen war. Das Verhältnis von Chlorophyll a zu Chlorophyll b zeigte keine signifikanten Änderungen.

4.1.2 Begasung im Licht

4.1.2.1 Begasung von freiem Chlorophyll a

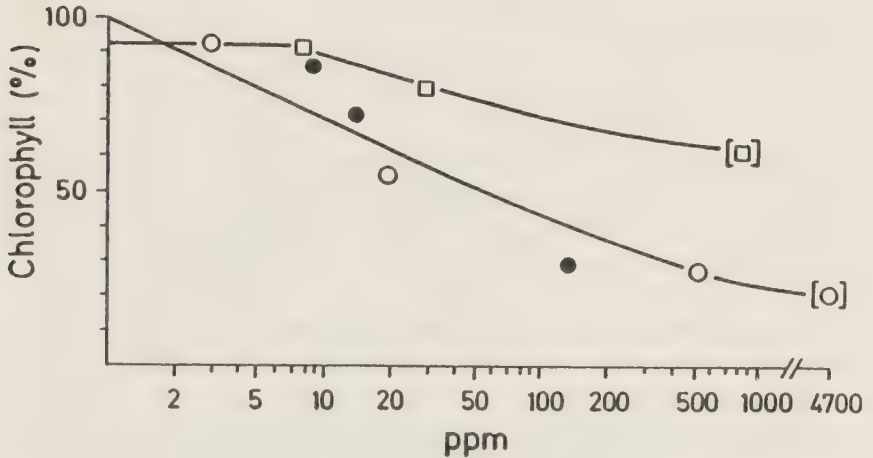


Abbildung 7: Restchlorophyllgehalt in Prozent nach 2-stündiger Begasung von isoliertem Chlorophyll a mit SO_2 , NO_x sowie mit SO_2/NO_x bei 1000 Lux
Lösungsmittel: Triton/Phosphatpuffer
Die Versuchsreihe wurde einmal durchgeführt.
Symbole wie in Abbildung 5.

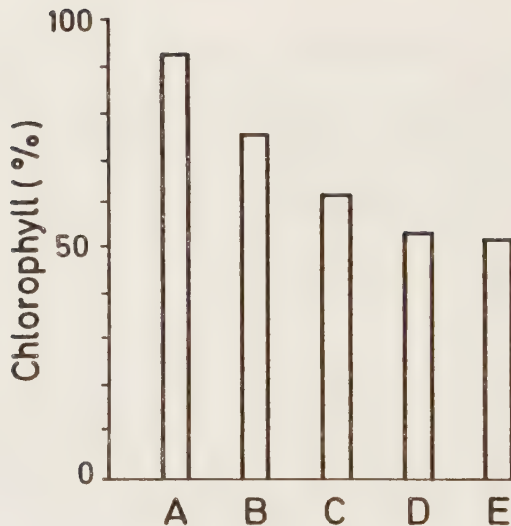


Abbildung 8: Vergleich der Restchlorophyllgehalte nach einer 2-stündigen Begasung von freiem Chlorophyll a mit je 30 ppm SO_2 (B), NO_x (C), O_3 (D) sowie 20 ppm SO_2 /30 ppm NO_x (E) bei 1000 Lux. (A) = Kontrolle nach 2 Stunden bei 1000 Lux
Mittelwert aus 2 Versuchen

Abbildung 7 zeigt die Pigmentabnahme nach einer 2-stündigen Begasung bei 1000 Lux (Tageslicht). Für die Begasung mit den Einzelkomponenten entsprach der qualitative Kurvenverlauf den im Dunkeln ermittelten Daten: NO_x verursachte im Vergleich zu SO_2 den größeren Ausbleicheffekt.

Bei der im Licht durchgeführten Mischbegasung kamen die Pigmentverluste in etwa den bei NO_x gemessenen Werten gleich. Im Dunkeln wurden die größten Abnahmen mit Stickoxiden festgestellt.

Mit SO_2 registrierte man mit und ohne Licht eine Pheophytinisierung von Chlorophyll bei ca. 1000 ppm. Dies war mit NO_x jedoch erst ab 4800 ppm zu beobachten. Unterhalb von 5 ppm waren die Ausbleichraten mit diesem Gas nicht

größer als 10% und entsprachen denen der Kontrolle.

Der Lichteinfluß spielte in diesem Zusammenhang eine tragende Rolle: obwohl die Reaktionszeiten um das 9-Fache reduziert waren, stellte man besonders im mittleren Konzentrationsbereich einen nur geringfügig flacheren Kurvenverlauf fest als im Dunkeln, wo die Begasungsdauer 18 Stunden betrug.

Auch bei der Ozonbegasung konnte unter dem Einfluß des Lichtes im Vergleich zum Dunkelwert (Restchlorophyllgehalt 80 - 85% nach 2 Stunden) eine starke Zunahme der Ausbleichrate festgestellt werden. Bei der getesteten Konzentration von 30 ppm wurde nach der 2-stündigen Inkubation bei 1000 Lux noch ein Restchlorophyllgehalt von 56% gefunden. Dies entsprach in etwa den Effekten, die mit der Mischbegasung und mit NO_x zu erreichen waren. Abbildung 8 zeigt einen Vergleich der Restchlorophyllgehalte bei Schadgaskonzentrationen von jeweils 30 ppm, wobei die Ausbleichraten für SO_2 , NO_x sowie für die Mischbegasung aus den Kurven in den Abbildungen 5 und 6 ermittelt wurden.

4.1.2.2 Begasung von thylakoid-gebundenem Chlorophyll

Tabelle 7: Restchlorophyllgehalte in Thylakoiden (in Phosphatpuffer suspendiert) nach einer 2-stündigen Begasung bei 1000 Lux

Zum Vergleich sind die Daten für das freie Pigment miteingetragen. Gaskonzentrationen in ppm. Die Versuchsreihe wurde einmal durchgeführt.

SO ₂	NO _x	% Chlorophyll	
		Thylakoide	freies Pigment
-	-	100	95
6 960		76 40	95 -1)
	10 470	82 44	72 30
3 6 12	5 10 20	74 70 70	90 75 65

1) Pheophytin

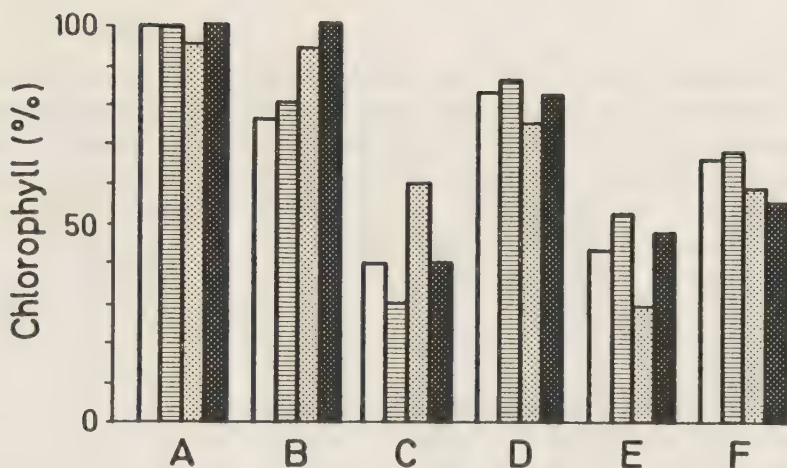


Abbildung 9: Vergleich der Restpigmentgehalte von freiem bzw. protein-gebundenem Chlorophyll nach 2- bzw. 18-stündiger Begasung im Licht bzw. unter Lichtausschluß mit den in Tabelle 7 angegebenen Schadgaskonzentrationen

Lösungsmittel: Triton/Phosphatpuffer bzw. Phosphatpuffer

A = 6 ppm SO_2 ; B = 960 ppm SO_2 ; C = 10 ppm NO_x ;
D = 470 ppm NO_x ; E = 6 ppm SO_2 /10 ppm NO_x

□ Chlorophyll, 2 h 1000 Lux; □ Thylakoide, 2 h 1000 Lux;

■ Chlorophyll, 18 h dunkel; ■ Thylakoide, 18 h dunkel.

Tabelle 7 zeigt einen Vergleich von freiem und thylakoid-gebundenem Chlorophyll bei Begasung mit verschiedenen Gaskonzentrationen. Besonders bei höheren Schadstoffdosen wiesen Thylakoide durchwegs höhere Restpigmentgehalte auf. Bei 960 ppm SO_2 trat bei freiem Chlorophyll zwar kein Ausbleicheffekt auf, jedoch wurde eine 100%-ige Pheophytinisierung beobachtet. Bei niedrigen Belastungswerten mit SO_2 sowie mit SO_2/NO_x wurden in Thylakoiden nach der Begasung geringere Pigmentkonzentrationen gemessen als in freiem Chlorophyll.

Aus Abbildung 9 ist ersichtlich, daß die Schadstoffe in

Verbindung mit Licht in Thylakoiden wie im freien Pigment verstärkte Bleichreaktionen verursachten. Ferner geht daraus hervor, daß der Unterschied in der Reaktivität von freiem und gebundenem Chlorophyll erst bei höheren Schadgaskonzentrationen zum Tragen kam, denn hier bleichten Thylakoide langsamer aus als das freie Pigment.

4.1.2.3 Begasung von freiem β -Carotin

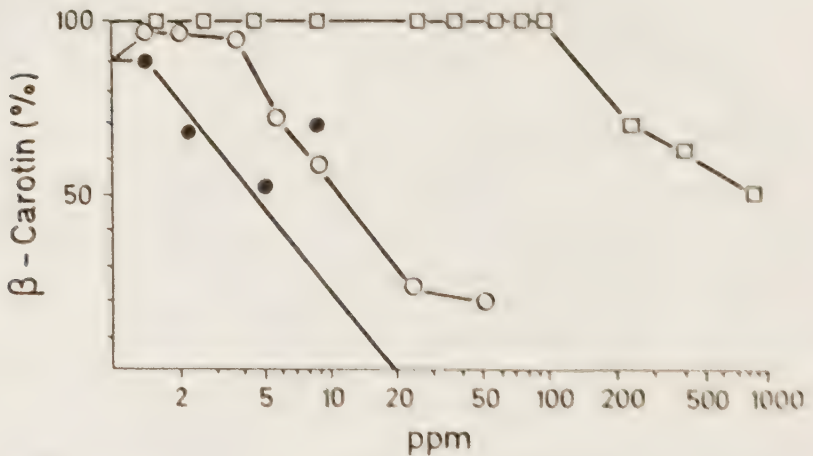


Abbildung 10: Restpigmentgehalt nach einer 2-stündigen Begasung von reinem β -Carotin mit SO_2 , NO_x und SO_2/NO_x in Aceton/Methanol/Wasser (40:155:15), bei 1000 Lux
Die Versuchsreihe wurde einmal durchgeführt.
Symbole wie in Abbildung 5.

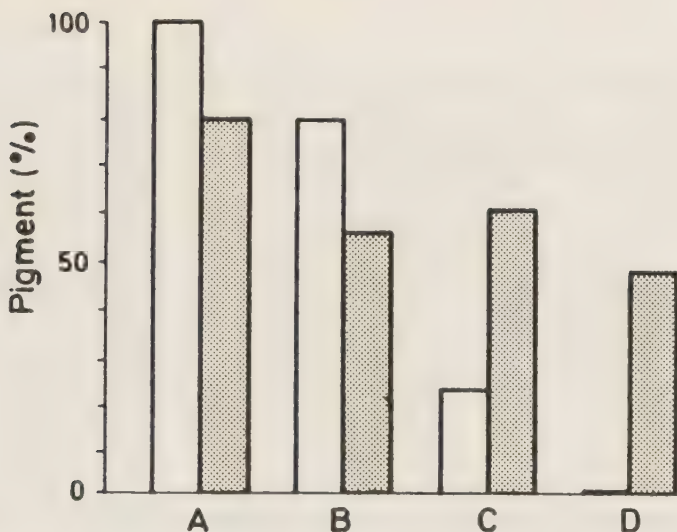


Abbildung 11: Restpigmentgehalte von freiem β -Carotin und freiem Chlorophyll a nach einer 2-stündigen Gasexposition mit je 30 ppm der angegebenen Schadgase bei 1000 Lux

Lösungsmittel: s. Abb. 10 und 7

A = SO_2 , B = O_3 , C = NO_x , D = 30 ppm $\text{NO}_x/18$

ppm SO_2 . $\square$ = β -Carotin ▨ = Chl a

Abb. 10 läßt auf eine hohe Empfindlichkeit von β -Carotin gegenüber dem Gasgemisch SO_2/NO_x sowie gegenüber NO_x schließen. Bei 20 ppm NO_x betrug der Verlust an β -Carotin 20%, bei der Mischbegasung kam es bereits bei der halben Stickoxidkonzentration zu einer völligen Pigmentzerstörung, wobei der Anteil an zugemischtem SO_2 auch bei diesen Experimenten konstant bei 0.6 lag.

Der Einfluß von SO_2 als Einzelgas manifestierte sich vorwiegend in einem Schutz vor Ausbleichung, erst bei höheren Konzentrationen trat ein Pigmentverlust ein, der jedoch weitaus geringer ausfiel als die Ausbleichraten, die mit NO_x sowie mit der Kombination NO_x/SO_2 gemessen wurden.

Ein Vergleich des Verhaltens von freiem Chlorophyll a und β -Carotin (Abb. 11) macht deutlich, daß dieses Pigment gegenüber NO_x sowie gegenüber dem Gasgemisch SO_2/NO_x sehr viel empfindlicher reagierte, gegenüber SO_2 war jedoch die Stabilität von β -Carotin größer als die von Chlorophyll a. Der Schwellenwert für eine einsetzende Bleichreaktion mit Schwefeldioxid war für β -Carotin im Vergleich zu Chlorophyll 15-fach erhöht (vergl. Tab. 9).

Wider Erwarten war der Verlust an β -Carotin nach der Einwirkung von Ozon, das wie NO_x oxidierend wirkt, nur gering. Er betrug bei einer Konzentration von 30 ppm nach einer 2-stündigen Begasungszeit 15%. Durch Zusatz von Linolensäure (β -Carotin : Linolensäure = 1 : 10) konnte die Ausbleichrate jedoch auf 35% gesteigert werden (nicht abgebildet).

4.1.2.4 Begasung von thylakoid-gebundenem β -Carotin

Tabelle 8: Ausbleichen von β -Carotin in Thylakoiden (in Phosphatpuffer suspendiert) bei 1000 Lux nach 2-stündiger Gasexposition
Gaskonzentrationen in ppm
einmalige Versuchsreihe, vergl. 3.1.6

SO_2	NO_x	% Restpigment
-	-	90
8	-	85
120	-	71
250	-	35
-	9	70
-	141	0
-	470	0
6	9	68
12	19	55
24	38	30

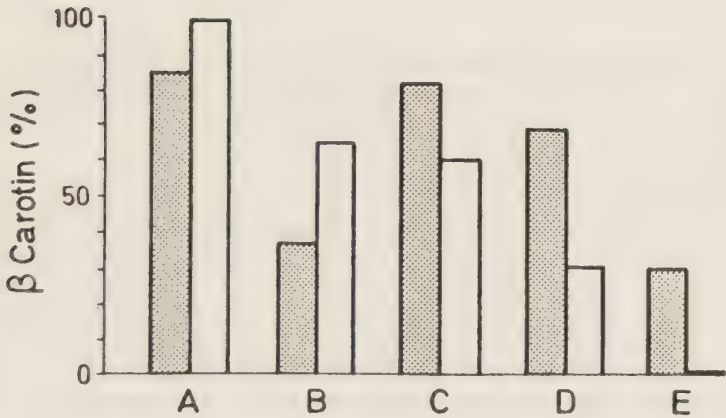


Abbildung 12: Vergleich der Restpigmentgehalte von β -Carotin in freier und thylakoid-gebundener Form nach 2-stündiger Begasung mit verschiedenen Schadgaskonzentrationen bei 1000 Lux

A = 8 ppm SO_2 ; B = 250 ppm SO_2 ; C = 9 ppm NO_x ;
 D = 6 ppm SO_2 / 9 ppm NO_x ; E = 24 ppm SO_2 /38
 ppm NO_x

□ = frei ■ = gebunden

Thylakoidgebundenes β -Carotin reagierte gegenüber SO_2 offenbar empfindlicher als das freie Pigment. NO_x sowie die Mischbegasung verursachten gleiche Pigmentabnahmen. Diese fielen erwartungsgemäß im Vergleich zum freien Pigment bei der Begasung von Thylakoiden geringer aus. (vergl. Abb. 12).

Bei einer Schadgaskonzentration von 30 ppm zeichnete sich für β -Carotin im Vergleich zum membrangebundenen Chlorophyll eine deutlich erhöhte Empfindlichkeit gegenüber NO_x sowie SO_2/NO_x ab, während SO_2 allein in beiden Fällen in etwa gleiche Ausbleichraten verursachte. Zu bemerken war ferner, daß NO_x auf membrangebundenes Chlorophyll im Gegensatz zu SO_2 und der Mischbegasung einen schwächeren Bleicheffekt ausübte, wohingegen im Falle von β -Carotin NO_x auch auf das

thylakoid-gebundene Pigment immer noch größere Auswirkungen zeigte, als SO_2 und die Mischbegasung (vergl. Abb. 9, 11, 12).

Tabelle 9: Schwellenwerte für das Ausbleichen von β -Carotin und Chlorophyll bei einer Gasexposition im Licht (2 h, 1000 Lux)
Gaskonzentrationen in ppm
(vergl. Tab. 7, 8 und Abb. 7, 10)

	SO_2	NO_x	SO_2/NO_x
Freies Pigment:			
Chlorophyll a	10	0	0
β -Carotin	150	5	1
Thylakoide:			
Chlorophyll a	7	10	5
β -Carotin	6	8	3

4.1.2.5 Begasung von thylakoid-gebundenen Xanthophyllen

Tabelle 10: Menge der einzelnen thylakoid-gebundenen Carotinoide in Prozent vom Gesamtcarotinoid-Gehalt nach Begasen mit verschiedenen Schadgaskonzentrationen (Gaskonzentration in ppm)
einmalige Versuchsserie, vergl. 3.1.6

SO ₂	NO _x	Gesamt-carotinoidgehalt	Nea	Viol	LuE	Ant	Lu	Car
-	-	100	12	14	0.5	0.9	44	28
9	-	91	10	7	0.8	1	53	28
120	-	77	12	13	0.9	1	58	28
-	9	86	10	11	0.9	1	52	24
	140	66	15	15	2	2	66	0
	470	38	26	5	3	1	41	0
6	9	73	9	12	2	2	48	28
12	18	76	9	14	0.9	1	53	22
24	36	63	13	8	2	2	62	12

Für die Xanthophylle ergaben sich im einzelnen folgende Tendenzen:

Neoxanthin erwies sich gegenüber der Einwirkung von NO_x, SO₂ sowie deren Mischung relativ resistent, sein Anteil am Gesamtpigment zeigte unter den gewählten Versuchsbedingungen insbesondere bei einer Begasung mit NO_x eine zunehmende Tendenz. Im Gegensatz hierzu wurde für Violaxanthin eine geringere Widerstandsfähigkeit festgestellt. Besonders gegenüber der kombinierten Begasung mit SO₂ und NO_x sowie mit Stickoxiden kam es zu einer Pigmentabnahme.

Luteinepoxid und Antheraxanthin nahmen bei den angewendeten Gaskonzentrationen stark zu, jedoch blieb ihr Anteil an der Pigmentsumme immer noch sehr gering und lag insgesamt nicht über 5%. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß die Trennung von Luteinepoxid und Antheraxanthin mit dem

verwendeten HPLC-System nur unvollständig gelang, daher sollte immer die Summe der beiden Pigmente betrachtet werden.

Lutein, das neben β -Carotin das mengenmäßig am stärksten vertretene Pigment war, zeigte keine größeren quantitativen Änderungen, lediglich bei der Mischbegasung wurde eine leichte Zunahme festgestellt.

β -Carotin nahm sowohl bei der Begasung mit NO_x wie auch mit SO_2/NO_x stark ab (vergl. Tab. 8), was mit den Beobachtungen in Einklang steht, die beim Einsatz des isolierten Pigments gemacht wurden (vergl. Tabelle 9).

4.1.2.6 Begasung von Hafer mit SO_2 , NO_x sowie mit SO_2/NO_x

Tabelle 11: Pigmentgehalte von 10 - 14 Tage altem Hafer in mg/g Fg und in Prozent nach 2-stündiger Begasung bei 1000 Lux

Mittelwert aus 2 Versuchen, vergl. 3.1.6

SO_2	NO_x	Chl a	%	Chl b	%	Chl a/Chl b	β -Car	%
-	-	2.02	100	0.74	100	2.73	0.14	100
300		2.28	113	0.72	97	3.16	0.11	78
	200	2.40	120	0.84	114	2.86	0.16	114
	700	1.77	80	0.70	76	2.50	0.10	70
300	470	1.02	50	0.41	55	2.49	0.07	46

Tabelle 12: Vergleich der Chlorophyllgehalte in Prozent nach Begasung von Hafer mit (1000 Lux) und ohne Licht
Mittelwert aus 2 Versuchen, vergl. 3.1.6

SO_2	NO_x	Chl a hell dunkel		Chl b hell dunkel		Chl a/Chl b hell dunkel	
-	-	100		100		2.73	
300	-	113	81	97	85	3.16	2.60
-	700	80	111	76	98	2.50	3.20
300	470	50	86	55	84	2.49	2.80

Mit 700 ppm NO_x war, verglichen mit den Dunkelversuchen, eine vermehrte Braunfärbung der Blattspitzen zu beobachten. Auch bei der Mischbegasung nahm das Welken und Umknicken der Pflanzen zu, das sich bereits im Dunkeln andeutete.

Die quantitativen Pigmentanalysen zeigten jedoch für die

Begasung mit den Einzelkomponenten keine nennenswerten Ausbleicheffekte. Ein deutlicher Pigmentverlust war erst bei der Mischbegasung festzustellen. Von diesem waren nicht nur die Chlorophylle betroffen, sondern auch β -Carotin, dessen Gehalt ebenfalls deutlich abnahm.

Tabelle 12 zeigt die prozentualen Chlorophyllgehalte nach einer 18-stündigen Dunkelbegasung sowie nach einer 2-stündigen Exposition bei 1000 Lux im Vergleich. Bei der Einwirkung von SO_2 wurde im Licht ein leicht erhöhter Chlorophyllgehalt gemessen, während derselbe Effekt mit NO_x im Dunkeln festzustellen war.

4.1.2.7 Begasung von Hafer mit Ozon

Tabelle 13: Chlorophyllgehalte in mg/g Fg nach 2-stündiger Begasung mit 60 ppm Ozon im Tageslicht und nach Pigmentextraktion in unterschiedlichen Zeitabständen
einmalige Versuchsreihe

Zeit [h]	Chl a	%	Chl b	%	Chl a/Chl b
0	1.99	87	0.81	93	2.46
3.5	1.83	80	0.76	86	2.41
24	1.76	77	0.77	87	2.02
48	1.23	54	0.70	80	1.54
96	1.33	58	0.40	46	1.26

Eine Begasung von Hafer mit 60 ppm Ozon für ca. 2 Stunden führte zu keiner signifikanten Chlorophyllabnahme. Auch der β -Carotiningehalt betrug nach der Gasexposition noch 86% der Kontrolle.

Unmittelbar nach der Begasung zeigte sich eine Schädigung in Form von wenigen weißen Flecken. Ein Welken oder Umknicken

der Pflanzen, wie es bei hohen Stickoxidkonzentrationen und bei der Mischbegasung registriert wurde, konnte jedoch nicht beobachtet werden.

Erst nach längerem Stehen (48h, Tag/Nacht-Rhythmus) stellte man größere Ausbleichraten fest, die mit einem Eintrocknen der Blätter einhergingen.

4.1.2.8 Begasung von Hafer mit Ozon in Kombination mit SO_2 und NO_x

Tabelle 14: Prozentualer Gehalt an Chlorophyll a, b in Haferpflanzen nach einer Einzelbegasung im Vergleich zur Pigmentkonzentration nach Begasung mit einem Zweiergemisch

Gaskonzentrationen in ppm, Mittelwert aus 2 Versuchen, vergl. 3.1.6

Gaskonzentration	Restpigmentgehalt	
	Chl a	Chl b
230 NO_x	120	114
230 $\text{NO}_x/60 \text{ O}_3$	74	83
300 SO_2	113	97
300 $\text{SO}_2/60 \text{ O}_3$	90	81
700 $\text{SO}_2/60 \text{ O}_3$	68	64
300 $\text{SO}_2/470 \text{ NO}_x$	50	55

Wie aus Tabelle 14 hervorgeht, führte ein Gasgemisch durchwegs zu größeren Ausbleichraten als die Einzelkomponenten. Bei der gleichzeitigen Begasung mit Ozon und SO_2 entsprachen die optischen Schäden denen, die auch mit Ozon allein auftraten.

Kombinierte man hingegen Ozon und NO_x , so war neben den

bereits erwähnten weißen "Ozonflecken" auch eine Braunfärbung sowie ein Welken der Blätter festzustellen.

Tabelle 15: Vergleich der Restpigmentgehalte als Maß für die Empfindlichkeiten von Photosynthesepigmenten in verschiedenen Aggregatzuständen gegenüber einer definierten Schadstoffbelastung.

Gaskonzentrationen in ppm

Die Werte für Chlorophyll und Thylakoide wurden den Kurven in den Abbildungen 5 und 6 entnommen (vergl. 3.1.6).

Gaskonzentration	Chlorophyll a						ß-Carotin ¹⁾		
	Chi a		Thyl		Pflanze		ß-Car	Thyl	Pflanze
	h	d	h	d	h	d			
300 SO ₂	70	50	40	55	113	81	65	40	78
700 NO _x	25	30	40	40	80	111	20	0	70
300 SO ₂ /470 NO _x	0	0	.	0	50	86	0	0	46
30 O ₃	50	.	.	.	.	.			
60 O ₃	.	.	.	.	86	.			

1) Die Werte wurden bei 1000 Lux gemessen.

4.1.2.9 Quantitative Veränderungen im Carotinoidhaushalt von Haferpflanzen

Tabelle 16: Carotinoidkonzentrationen in Hafer in ug/g Fg und in (%) nach 2-stündiger Begasung mit verschiedenen Konzentrationen SO₂, NO_x sowie SO₂/NO_x bei 1000 Lux
Gaskonzentrationen in ppm
Mittelwert aus 2 Versuchen

SO ₂	NO _x	Gesamt-carotinoidgehalt	Nea	Viol	LuE	Ant	Lu	β-Car
-	-	349.38 (100)	35 (100)	41 (100)	1.20 (100)	2.18 (100)	130 (100)	140 (100)
300		350.00 (100)	39 (111)	44 (107)	1.40 (117)	5.20 (238)	150 (115)	110 (79)
	200	556.60 (159)	65 (186)	74 (180)	2.50 (208)	10.10 (463)	244 (188)	160 (114)
	470	297.53 (85)	26 (74)	26 (63)	1.16 (97)	4.37 (200)	110 (85)	130 (93)
300	470	224.00 (64)	28 (80)	14 (34)	0.66 (55)	5.60 (257)	111 (85)	65 (46)

Tabelle 17: Vergleich der prozentualen Carotinoidgehalte von Thylakoiden sowie von Haferpflanzen nach 2-stündiger Begasung mit SO_2 , NO_x und SO_2/NO_x Konzentrationsangaben in ppm
K = Kontrolle, vergl. 3.1.6

Pigment	Thylakoide				Hafer			
	Anteil am Gesamt pigmentgehalt				Anteil am Gesamt pigmentgehalt			
	K -	SO_2 250	NO_x 470	SO_2/NO_x 24/36	K -	SO_2 250	NO_x 470	SO_2/NO_x 300/470
Gesamtcarotinoid- gehalt	100	84	38	63	100	100	85	64
Neoxanthin	12	19	26	12	10	11	9	12
Violaxanthin	14	17	5	8	12	12	7	6
Luteinepoxid	0.5	0.9	3	2	0.2	0.4	0.4	0.4
Antheraxanthin	0.9	1	0.9	2	0.6	1.5	1.5	2.6
Lutein	45	55	45	60	40	43	38	50
β -Carotin	30	30	0	15	40	30	40	30

Die in Tabelle 16 und 17 aufgeführten Daten lassen über das Verhalten der Carotinoide in Thylakoiden und Hafer bei einer Begasung mit SO_2 , NO_x sowie mit SO_2/NO_x folgende Aussagen zu:

1. Gesamtcarotinoidgehalt

Der Carotinoidgehalt in Thylakoiden nimmt mit steigender Begasungskonzentration ab. Intaktes Pflanzenmaterial verhält sich analog, lediglich bei 200 ppm NO_x kann eine Zunahme der Pigmente beobachtet werden.

2. Neoxanthin

Die SO_2 -Begasung bewirkt sowohl in Thylakoiden wie in Pflanzen eine Vergrößerung des Neoxanthinanteils am Gesamtpigment, während NO_x vor allem in Thylakoiden zu einer starken Erhöhung dieser Komponente führte.

3. Violaxanthin

Auch hier wirkt sich SO_2 sowohl in Thylakoiden als auch in Pflanzen auf den Pigmentgehalt eher konservierend aus, während NO_x sowie die Mischbegasung eine Verringerung desselben zur Folge hat.

4. Antheraxanthin und Luteinepoxid

Sowohl in Thylakoiden wie in Pflanzen führt die Schadgasbelastung mit SO_2 , NO_x und SO_2/NO_x zu einer Zunahme des Anteils dieser beiden Pigmente an der Gesamtcarotinoidkonzentration.

5. Lutein bzw. Zeaxanthin

Der Gehalt an Lutein bzw. Zeaxanthin wird offenbar durch die Mischbegasung am stärksten beeinflusst. Hier kommt es in Thylakoiden ebenso wie in Pflanzen zu einer Erhöhung des Anteils am Gesamtpigmentgehalt.

6. β -Carotin

β -Carotin zeigt gegenüber einer Begasung mit reinem NO_x besondere Empfindlichkeit. In Thylakoiden kann bei höheren NO_x -Konzentrationen sogar eine völlige Zerstörung dieses Pigments beobachtet werden, jedoch führte auch die Mischbegasung zu einer beträchtlichen Reduktion des β -Carotinanteils. In intakten Pflanzen zeigten sich dieselben Tendenzen, jedoch in abgeschwächter Form.

7.

Die Xanthophylle verhalten sich bezüglich einer Gasexposition in Thylakoiden wie in Pflanzen analog.

4.1.3 Quantitative Pigmentveränderungen in Haferpflanzen

Tabelle 18: Verhältnis der Xanthophyllsumme zu β -Carotin (Xant/Car) sowie der Quotient Chlorophyll a:Chlorophyll b (Chl a:Chl b) von zuvor begastem (200 ppm NO_x) und von unbegastem Hafer während der 7-tägigen Dunkelinkubation
einmalige Versuchsreihe

Dunkel- inkubations- zeit [d]	unbegast		begast	
	Chl a:Chl b	Xant/Car	Chl a:Chl b	Xant/Car
0	2.73	1.49	2.15	1.56
2	1.69	1.15		
4	1.85	1.75		
7	2.47	1.89	1.93	2.08

Tabelle 19: Vergleich der prozentualen Pigmentgehalte von begastem und seneszentem sowie begastem Hafer, der anschließend einer Seneszenzbehandlung unterzogen wurde

Gaskonzentrationen in ppm

K = unbegaste Kontrollpflanze, 100% = unbegaste Kontrollpflanze vor der Dunkelinkubation
einmalige Versuchsreihe

Fortsetzung S. 62

Gaskonzentration	Dunkelinkubationszeit [d]				
	0	2	4	7	
Kontrolle 200 NO _x 500 NO _x 300 SO ₂ 300 SO ₂ /470 NO _x	100 160 85 100 58	60 100	40	35 35	Gesamtcarotin- oidsomme
Kontrolle 200 NO _x 500 NO _x 300 SO ₂ 300 SO ₂ /470 NO _x	100 186 72 115 80	50 80	30	25 20	Neoxanthin
Kontrolle 200 NO _x 500 NO _x 300 SO ₂ 300 SO ₂ /470 NO _x	100 180 62 105 43	35 98	55	55	Violaxanthin
Kontrolle 200 NO _x 500 NO _x 300 SO ₂ 300 SO ₂ /470 NO _x	100 200 98 110 55	100 300	150	105 150	Luteinepoxid
Kontrolle 200 NO _x 500 NO _x 300 SO ₂ 300 SO ₂ /470 NO _x	100 460 200 230 250	50 50	100 80	115 70	Antheraxanthin
Kontrolle 200 NO _x 500 NO _x 300 SO ₂ 300 SO ₂ /470 NO _x	100 180 86 115 85	58 85	50	45 48	Lutein

Tabelle 19, Fortsetzung

Kontrolle	100	70	40	35	β -Carotin
200 NO _x	118	135		55	
500 NO _x	70				
300 SO ₂	80				
300 SO ₂ /470 NO _x	45				
Kontrolle	100	28	10	7	Chlorophyll a
200 NO _x	120	76		10	
500 NO _x	95				
300 SO ₂	113				
300 SO ₂ /470 NO _x	50				
Kontrolle	100	40	15	8	Chlorophyll b
200 NO _x	115	96		12	
500 NO _x	90				
300 SO ₂	97				
300 SO ₂ /470 NO _x	56				

Mit fortschreitendem Alterungsprozeß war erwartungsgemäß eine raschen Chlorophyllabnahme zu verzeichnen, während die Carotinoidpigmente etwas langsamer degradierten.

Sowohl vor wie während der Seneszenz wurde der Hauptanteil der Carotinoidsumme zu etwa gleichen Teilen von Lutein und β -Carotin getragen. Die relative Carotinoidzusammensetzung blieb also während des Alterungsprozesses weitgehend erhalten.

Der Violaxanthin- und Neoxanthingehalt verringerte sich anfangs, jedoch war nach einer 4-tägigen Dunkelinkubation ein erneuter Anstieg von Violaxanthin um ca. 15% festzustellen, der auch am 7. Tag des Seneszenzprozesses noch bemerkbar war. Ebenso spiegelte sich dies in der relativen Zunahme des Anteils am Gesamtpigment wieder.

Für Luteinepoxid und Antheraxanthin wurde im Verlauf der Seneszenz eine Zunahme festgestellt. Die Konzentration dieser Pigmente übertraf am 4. bzw. am 7. Tag den Kontrollwert von 100% (= nicht dunkelgestellter Hafer), so daß von einer vorübergehenden Akkumulation dieser Pigmente während der Seneszenz gesprochen werden kann. Der relative

Anteil beider Pigmente an der Carotinoidsumme fiel jedoch mit maximal 1.1% bzw. 1.7% sehr gering aus. Lutein hingegen nahm nur schwach ab und hatte auch nach einer 7-tägigen Dunkelinkubation noch den größten Anteil an der Carotinoidsumme.

Für die Summe der Carotinoide ergab sich somit nach einer 4-tägigen Dunkelinkubation insgesamt ein Verlust von ca. 50%, der sich bis zum 7. Tag kaum noch weiter fortsetzte.

Die Chlorophylldegradation hingegen zeigte einen etwas anderen Verlauf: Hier kam es während des 7-tägigen Beobachtungszeitraumes zu einer raschen, stetigen Abnahme um maximal 90%, wobei Chlorophyll a schneller abnahm als Chlorophyll b, was aus dem zeitlichen Verlauf des Quotienten Chl a/Chl b geschlossen werden konnte.

Die Pflanzen, die vor der Dunkelinkubation mit NO_x begast wurden, zeigten ein analoges Seneszenzverhalten: trotz des anfangs erhöhten Gesamtpigmentgehaltes fand auch hier während des 7-tägigen Beobachtungszeitraumes eine kontinuierliche Abnahme von Chlorophyll, β -Carotin sowie von Lutein auf die Werte der Kontrolle statt. Der relative Anteil der beiden letzten Pigmente an der Carotinoidsumme lag konstant zwischen 30% und 40% und entsprach dem der Kontrollpflanzen.

Der Neoxanthingehalt nahm ebenfalls rasch ab und erreichte nach 7 Tagen in etwa die Werte der Kontrolle. Auch für Violaxanthin ergab sich eine Abnahme auf das Konzentrationsniveau von unbegasteten Pflanzen, so daß auch hier während des Alterungsprozesses wie bei den Kontrollpflanzen eine Zunahme des Violaxanthinanteils an der Pigmentsumme zu verzeichnen war.

Antheraxanthin und Luteinepoxid zeigten im Vergleich zur Kontrolle etwas größere Akkumulationserscheinungen. Hier überlagerten sich offenbar die Effekte von Seneszenz und

Begasung, denn auch im Vergleich zu begasten, nicht dunkelgestellten Kontrollpflanzen war der Anteil beider Pigmente am Gesamtpigment mit 1.6% bzw. 2.4% etwas höher. Dies hatte jedoch auf die Carotinoidsumme immer noch keinen Einfluß. Sie sank nach 7 Tagen in begastem wie in unbegastem Material auf Werte zwischen 50% und 60% der Kontrolle ab.

Beim Vergleich der seneszenten Pflanzen mit begasten, nicht dunkelgestellten Pflanzen gelangte man zu folgenden Ergebnissen:

Die Akkumulation von Antheraxanthin und Luteinepoxid stand im Einklang mit den Beobachtungen, die auch in gealtertem Material gemacht wurden.

Lutein verhielt sich sowohl gegenüber einer durch Begasung hervorgerufenen Degradation wie auch während der Seneszenz relativ indifferent.

β -Carotin wurde durch die Schadgaseinwirkung im Vergleich zu Lutein stärker in Mitleidenschaft gezogen, wobei NO_x die ausgeprägtesten Effekte zeigte. Auch dieses Verhalten entsprach dem Verlauf der Gehalte dieser Pigmente während der Seneszenz.

Der relative Anteil von Violaxanthin an der Pigmentsumme zeigte jedoch eine eher gegenläufige Tendenz, denn dieser nahm besonders bei der Mischbegasung sowie bei hohen NO_x -Konzentrationen ab, während der Neoxanthinanteil an der Carotinoidkonzentration relativ unverändert blieb.

Mit Ausnahme von Violaxanthin und Neoxanthin zeigten alle Pigmente bei genügend hohen Schadstoffdosen die gleichen Tendenzen wie bei einer Alterung. Auch die Chlorophyllkonzentration nahm, wenn auch nicht in dem bei der Seneszenz festgestellten Ausmaß ab, sofern kein Düngeeffekt festzustellen war.

Tabelle 20: Veränderung des Anteils der einzelnen Pigmente an der Carotinoidsumme während der Seneszenz von begastem (200 ppm NO_x) und unbegastem Hafer im Vergleich mit den Pigmentverhältnissen nach einer 2-stündigen Schadgasexposition bei 1000 Lux

	Nea	Viol	LuE/Ant	Lu	Car	Chl a/Chl b	Car
Seneszenz, unbegast	--	- 1)	+	-	-	--/-	-
Seneszenz, begast	--	- 1)	++	-	-	--/-	-
Gasexposition (vergl. Tab.12)							
SO ₂	+	+	+ / ++	+ -	+ -	- / - 2)	- 3)
NO _x	+	-	+ / ++	+ -	--	"	-
NO _x /SO ₂	+ -	-	+ / ++	+	-	"	-

-- = (starke) Abnahme, ++ = (starke) Zunahme

- 1) Schwache Abnahme, Anteil an der Carotinoidsumme steigt etwas an.
- 2) Schwache Abnahme bei höheren Schadstoffdosen, wobei Chlorophyll a im Vergleich zu Chlorophyll b die größeren Abnahmen zeigt.
- 3) Schwache Abnahme, jedoch größer als bei Chlorophyll.

4.1.4 Quantitative Pigmentveränderungen in etioliierten Haferpflanzen

4.1.4.1 Versuche zur Chlorophyllbiosynthese

Belichtungsversuche

Tabelle 21: Pigmentkonzentrationen in $\mu\text{g} \times 10^{-3}/\text{g}$ Fg und Photoumwandlung von 50 bzw. 72 h altem 2, 2'-bispyridinbehandeltem¹⁾ sowie von NO_x -gastem Hafer bei verschiedenen Belichtungsverhältnissen.

	Proto pheid	%	Phe	%	Photoum- wandlung %
Dunkelkontrollen					
unbehandelt, 50 h	2.46	100	0.12	-	-
behandelt, 50 h	3.79	154	-	-	-
200 ppm NO_x , 50 h	3.26	130	-	-	-
unbehandelt, 72 h	3.29	100	-	-	-
behandelt, 72 h	2.88	96	-	-	-
Blitzbelichtung					
unbehandelt, 50 h	1.58	100	2.20	100	58
behandelt, 50 h	2.28	144	1.80	81	44
unbehandelt, 72 h	2.07	100	2.61	100	55
behandelt, 72 h	2.11	102	2.34	89	52
4 h, 5000 Lux					
unbehandelt, 50 h	4.72	100	20.94	100	81
behandelt, 50 h	1.95	41	4.72	23	71
200 ppm NO_x , 50 h	4.86	103	18.84	90	79
unbehandelt, 72 h	6.41	100	19.39	100	75
behandelt, 72 h	4.21	66	13.93	72	77

1) 1 mM 2, 2'-Bispyridin

Bei einer 4-stündigen Belichtung zeigte sowohl 50 wie auch 72 h alter Hafer Photoumwandlungsraten, die nur wenig von den Kontrollwerten abwichen. Die absolute Chlorophyllproduktion war jedoch bei 50 h alten 2, 2'-bispyridinbehandelten Pflanzen mit 23% des Wasserwertes weitaus niedriger als die von 72 h altem Material. Demgemäß zeigte auch der Gehalt an Protopheophorbid in den belichteten Pflanzen ein analoges Verhalten.

Im Einklang hiermit standen die Ergebnisse, die bei der Blitzbelichtung gewonnen wurden. Hier wichen die Photoumwandlungsraten ebenfalls nur wenig von denen der Kontrolle ab. 50 h alter inkubierter Hafer zeigte wiederum die geringste Photoumwandlungsrate sowie die niedrigste Pheophytinkonzentration.

Beachtenswert war jedoch die starke Anhäufung von Protopheophorbid in inkubiertem Hafer desselben Alters, eine Erscheinung, die bei den Dunkelkontrollen noch stärker zutage trat. Es zeigten sich auch hier deutliche Differenzen zwischen 2 und 3 Tage altem Hafer, wobei letzterer offenbar keine Tendenz zu einer Pigmentakkumulation erkennen ließ.

Das Verhalten von begasten und 2, 2'-bispyridin-inkubierten Pflanzen ließ nur wenige Parallelen erkennen. Lediglich im Dunkeln war bei der Begasung mit 200 ppm NO_x ebenfalls eine Anhäufung von Porphyrinen zu verzeichnen, während sich bei der 4-stündigen Belichtung begaster Pflanzen bezüglich der Photoumwandlung sowie der absoluten Pigmentkonzentration keine Unterschiede zur Kontrolle ergaben.

Bestimmung der Veresterungsrate

Tabelle 22: Veresterungsraten c Chl/ Σ Chl(id) in Prozent von 50 bzw. 72 h altem 2, 2'-bispyridin-¹⁾ (= 2, 2') und schadgasbehandeltem Hafer
 Konzentrationsangaben in $\mu\text{g} \times 10^{-3}/\text{g Fg}$,
 $\Sigma\text{Chl(id)} = (\text{Chl a} + \text{Chlid})$
 Mittelwert aus 3 Versuchen

	Σ Chl(id)	Pchlid	Chl	Chlid	c Chl/ $\Sigma\text{Chl(id)}$
50 h					
Kontrolle	1.95	2.27	2.20	-	100
5 ppm SO ₂	2.06	1.90	2.00	-	97
5 ppm NO _x	2.07	1.74	2.09	-	100
2 ppm SO ₂ / 2 ppm NO _x	1.70	1.17	1.68		100
2, 2'	1.19	2.36	0.56	0.63	53
72 h					
Kontrolle	2.35	2.52	2.12	0.23	90
2, 2'	2.56	3.04	2.15	0.35	86

1) 1 mM 2, 2'-Bispyridin

Die Veresterungsraten von 50 h altem Hafer ließen keine Beeinflussung der Chlorophyllbiosynthese durch Schadgase erkennen.

Gleichalter, 2, 2'-bispyridin-behandelter Hafer erwies sich diesbezüglich jedoch als relativ empfindlich, da hier nur ca. 50% des Chlid verestert wurden. 72 h alter Hafer hatte diese Sensibilität bereits weitgehend wieder verloren, was aus den gleichen Veresterungsraten von Kontrollpflanzen sowie inkubierten Pflanzen zu erkennen war.

4.1.4.2 Carotinoidanalysen

Tabelle 23: Gesamtcarotinoidgehalt (Car) in $\mu\text{g} \times 10^{-3}/\text{g}$ Fg von etioliertem Hafer nach 2, 2'-Bispyridin- (= 2, 2') bzw. Schadgasbehandlung im Dunkeln und anschließender Exposition bei verschiedenen Belichtungsverhältnissen

	Car	%
	50 h/72 h	50 h/72 h
Blitzbelichtung + 1 h Dunkelinkubation		
Kontrolle	14.01/ 17.19	100/100
5 ppm SO ₂	13.30/ -	94/ -
5 ppm NO _x	13.30/ -	94/ -
2 ppm SO ₂ /	1.00/ -	78/ -
2 ppm NO _x		
2, 2'	7.70/ 16.08	88/ 90
Blitzbelichtung + sofortige Extraktion		
Kontrolle	8.70/ 12.4	100/100
2, 2'	8.90/ 10.5	100/ 85
4 h, 5000 Lux		
Kontrolle	83.00/138	100/100
200 ppm NO _x	66.00/ -	80/ -
2, 2'	69.00/127	83/ 92
Dunkelwerte		
Kontrolle	6.01/ 6.81	100/100
2, 2'	5.10/ 6.13	85/ 90
200 ppm NO _x	1.80/ -	30/ -

Im Vergleich zu den Chlorophyllen zeigten sich bei den Carotinoiden andere Tendenzen. Eine Behandlung mit 2, 2'-Bispyridin führte hier nur zu geringen Pigmentabnahmen, wobei keine Unterschiede zwischen 50 und 72 h altem Hafer auftraten. Bei einer Begasung der Pflanzen mit 200 ppm

NO_x trat zwar im Dunkeln ein Pigmentverlust von 70% auf, der jedoch nach der 4-stündigen Belichtung wieder ausgeglichen war.

Ein wichtiges Ergebnis dieser Experimente war die besondere Empfindlichkeit von 50 h altem Hafer gegenüber 2, 2'-Bispyridin. Dies manifestierte sich besonders in der im Vergleich zu den Kontrollpflanzen geringeren Veresterungsrate sowie in einem allgemein reduzierten Pigmentgehalt nach der 4-stündigen Belichtung. Letztere hatte jedoch auf die Photoumwandlungsrate keinen Einfluß. Diese lag auch im chemikalienbehandelten Hafer nur wenig unter der der Kontrollpflanzen.

Im Gegensatz hierzu war bei den schadgasexponierten Pflanzen keine signifikante Beeinflussung auf dieser Stufe der Chlorophyllbiosynthese ersichtlich.

4.2 Qualitative Pigmentanalysen

Zur qualitativen Analytik der Produkte, die bei der Begasung mit NO_x , SO_2 sowie mit einer Kombination dieser beiden Komponenten entstanden, wurden dünnschichtchromatographische Methoden, HPLC und die Absorption im sichtbaren Bereich herangezogen. Sämtliche Spektren wurden, sofern nicht anders angegeben, in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.4 aufgenommen, der 0.1% Triton enthielt.

4.2.1 Begasung unter Lichtausschluß

4.2.1.1 Begasung von Chlorophyll und Thylakoiden mit NO_x

Absorptionsspektren

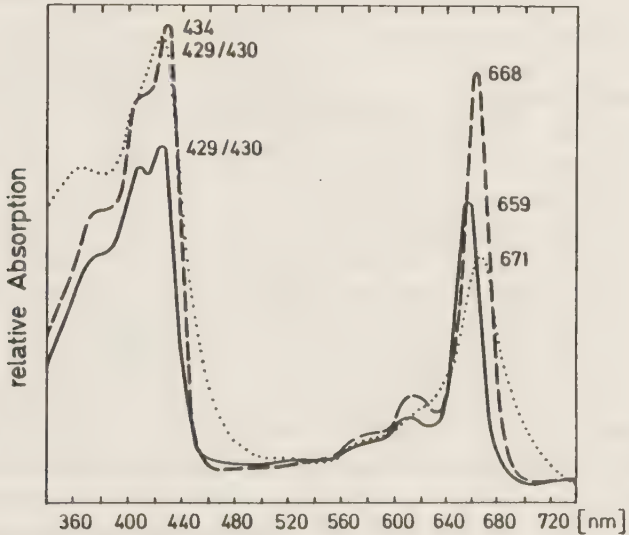


Abbildung 13: Absorptionsspektrum von Chlorophyll a vor (---) und nach der Begasung (...) mit 50 ppm NO_x . Zum Vergleich ist das Absorptionsspektrum nach Begasung mit 200 ppm SO_2 miteingetragen (—)

Tabelle 24: Lage der Absorptionsmaxima einer Lösung von Chlorophyll a (b) bzw. von Thylakoiden in 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.4 mit 0.1% Tritonzusatz (für Thylakoide: Phosphatpuffer ohne Tritonzusatz) vor und nach einer 18-stündigen Dunkelbegasung mit 50 bzw. 200 ppm NO_x

	Extinktionsmaxima	
	vorher	nachher
Chlorophyll a	435 669	431 672
Chlorophyll b	464 649	457 650
Thylakoide	436 672	436 670
unbegaste Pigmente	keine Verschiebung	

Tabelle 25: Zunahme des Verhältnisses Soretbande : langwelliger Bande (S:L) für Chlorophylle und Thylakoide nach einer 18-stündigen Dunkelinkubation mit steigenden Stickoxidkonzentrationen (Gaskonzentration in ppm)

NO_x	S:L		
	Chl a	Chl b	Thylakoide
-	1.33	2.63	1.43
0.5	1.22		
2	1.22		
4	1.12		
5	1.36		
10	1.39	3.34	1.51
20	1.97		1.49
30	1.63		1.48
40	1.64		
50	2.02		
95	2.15		

Abbildung 13 zeigt das Absorptionsspektrum von Chlorophyll a vor und nach einer 18-stündigen Dunkelbegasung mit 50 ppm NO_x . Sowohl im Soretbereich wie im langwelligen Extinktionsbereich konnte nur eine geringfügige Verschiebung der Maxima festgestellt werden. Diese setzte für Chlorophyll a bei einer Konzentration von ca. 30 ppm NO_x ein und vergrößerte sich auch bei einer Erhöhung der Stickoxiddosis nicht mehr.

Für Chlorophyll b wurde der Beginn der Peakverschiebung nicht bestimmt, jedoch war diese auch bei 50 ppm noch relativ gering. Thylakoide zeigten bei derselben Schadgaskonzentration ebenfalls ein indifferentes Verhalten; es trat praktisch keine Änderung der Lage des Absorptionsmaximums ein (vergl. Tab. 24). Die Absorptionsspektren von Chlorophyll b und von Thylakoiden wiesen im Vergleich zur Kontrolle keine signifikanten Maximaverschiebungen auf und wurden daher nicht abgebildet.

Im Gegensatz hierzu war die Änderung des Quotienten S:L, insbesondere für Chlorophyll a relativ groß. Mit steigender Schadgasmenge kam es zu einer Zunahme um fast 70%. Für Chlorophyll b konnte ebenfalls eine Zunahme von S:L gemessen werden, die jedoch im Vergleich zu Chlorophyll a um 40% geringer ausfiel. Thylakoide verhielten sich auch in dieser Beziehung indifferent (vergl. Tab. 25).

Chromatographie

Dünnschichtchromatographie (System 3)

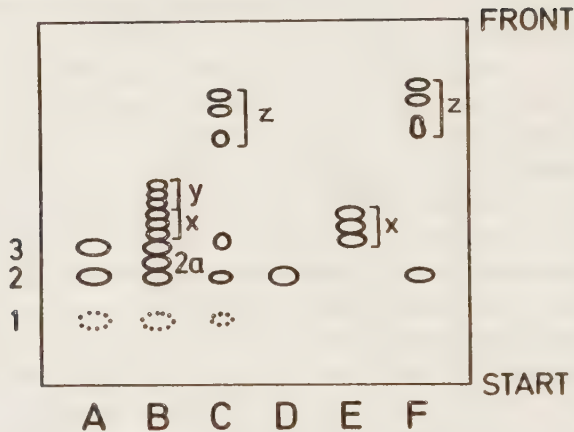


Abbildung 14: Dünnschichtchromatogramm der Umsetzung (18 h im Dunkeln) von Thylakoiden bzw. Chlorophyll a mit 200 bzw. 50 ppm NO_x (Spur B bzw. E)

Zum Vergleich sind die Produkte der Umsetzung von Thylakoiden bzw. Chlorophyll a (Spur C bzw. F) mit SO_2 unter denselben Reaktionsbedingungen miteingezeichnet

1A = Pheophytin a (0.21), 2A = Chlorophyll a (0.30), 3A = Chlorophyll b (0.40), 2a = Hydroxychlorophyll (0.33), X (Y) = Produkte, die aus Chlorophyll a (b) und NO_x entstanden sind, Z = Produkte, die aus Chlorophyll a und SO_2 entstanden sind, (R_f -Werte in Klammer)

Bei der Begasung von Chlorophyll a bzw. Chlorophyll b sowie von Thylakoiden mit NO_x entstanden die schadgasspezifischen Produkte X bzw. Y. Mit den R_f -Werten 0.40, 0.43, 0.48 bzw. 0.50 - 0.55 für Y. Spur B zeigt diese Verbindungen Y, die mit dem verwendeten System 3 nur unscharf getrennt wurden.

Eine quantitative Umsetzung von Chlorophyll a zu X trat ab ca. 50 ppm NO_x ein. Aus dem Dünnschichtchromatogramm geht ferner hervor, daß mit der eingesetzten Gaskonzentration von 50 ppm neben den Produkten X (Y) noch 13^2 -Hydroxychlorophyll a (R_f -Wert: 0.33) entstand.

Die Bildung von X sowie von 13^2 -Hydroxychlorophyll hing von der eingesetzten Schadgaskonzentration ab. Im Bereich von 10 - 20 ppm überwog letztere Verbindung, sie wurde jedoch mit steigender Schadgaskonzentration immer mehr zugunsten der Produkte X zurückgedrängt. Auffallend war die fehlende Fluoreszenz der Produkte X (Y) bei 254 nm, die i. allg. als charakteristisches Merkmal aller Chlorophylle gilt.

HPLC

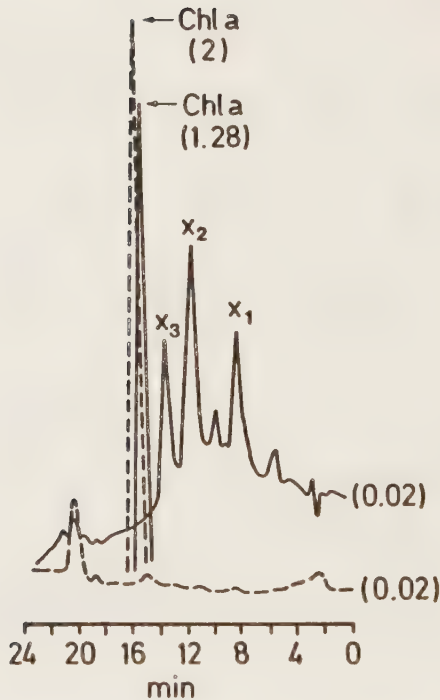


Abbildung 15: HPLC-Elutionsdiagramm (System 1) der Abbauprodukte von Chlorophyll a nach Begasung mit 50 ppm NO_x

Die Verstärkung, mit der das Diagramm aufgenommen wurde, ist in Klammern angegeben

(—): Absorption bei 656 nm

(---): Fluoreszenz > 600 nm

Das Elutionsdiagramm eines Pigmentextraktes aus Thylakoiden entsprach dem von intakten Pflanzen (vergl. Abb. 12) und wurde daher nicht abgebildet.

Abbildung 15 zeigt das typische Elutionsmuster der 3 NO_x spezifischen Derivate $X_1 - X_3$. Die Retentionszeiten dieser nichtfluoreszierenden Verbindungen lagen bei 8, 11 und 13 Minuten.

Ein analoges, aber nicht identisches Substanzmuster entstand bei der Begasung von Chlorophyll b mit NO_x (nicht abgebildet). Hier betrugen die Retentionszeiten für die Produkte $Y_1 - Y_3$ 5, 9 und 11 Minuten.

Das Verhältnis, in dem die Produkte $X_1 - X_3$ bzw. $Y_1 - Y_3$ entstanden, war bei einer quantitativen Umsetzung des Edukts relativ konstant. Es lag für X bei 1:2:1 und für Y bei 1:2:2 (mit steigenden Retentionszeiten).

Bei der Begasung von Tylakoiden mit NO_x erhielt man ein Gemisch mehrerer nur unscharf getrennter Produkte (vergl. Abb. 16), wobei nach einem Vergleich mit dem Dünnschichtchromatogramm (Abb. 16) davon ausgegangen werden mußte, daß es sich hier größtenteils um ein Gemisch der Produkte X und Y handelte.

4.2.1.2 Begasung von Hafer mit NO_x

Absorptionsspektrum

Das Absorptionsspektrum eines Pigmentextraktes aus NO_x -begastem Hafer zeigte im Vergleich zur Kontrolle weder im Soretbereich noch im langwelligen Bereich eine Peakverschiebung und wurde daher nicht zur Produktcharakterisierung herangezogen.

Dünnschichtchromatographie bzw. HPLC

Dünnschichtchromatogramm

Bei der Begasung von Hafer mit NO_x entstanden in qualitativer Hinsicht dieselben Produkte wie bei der Begasung von Thylakoiden (vergl. Abb. 14, Spur B).

HPLC

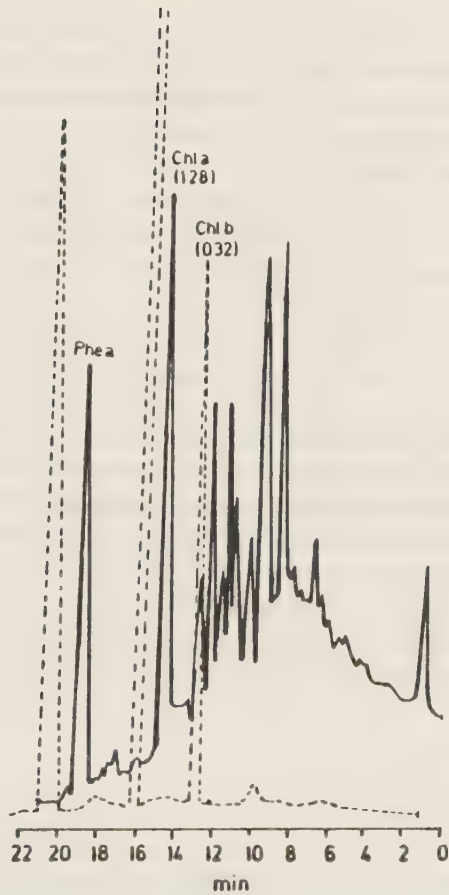


Abbildung 16: HPLC-Elutionsdiagramm der Abbauprodukte von Hafer nach Begasung mit 500 ppm NO_x
 Die Verstärkung, mit der das Diagramm aufgenommen wurde, ist in Klammern angegeben
 (—) Absorption bei 656 nm
 (---) Fluoreszenz > 600 nm

Tabelle 26: Prozentuales Verhältnis von Produkt (P) zu nicht verändertem Chlorophyll (Chl), P: Chl, in Hafer nach einer 18-stündigen Dunkelinkubation mit verschiedenen Konzentrationen NO_x

ppm NO_x	P: ΣChl
Kontrolle	-
200	-
500	3.22
700	7.50

Tabelle 26 beweist, daß in Hafer unter Lichtausschluß selbst bei Verwendung extrem hoher Schadstoffdosen nur sehr geringe Mengen an schadstoffspezifischen Abbauprodukten entstehen. Die Begasung von Pflanzen mit NO_x sollte daher im Dunkeln nicht mehr weiter untersucht werden.

4.2.1.3 Versuche zur Charakterisierung der Produkte X

Pheophytinisierung

Absorptionsspektren

Die Lage der Absorptionsmaxima der pheophytinisierten Probe X entsprach der von reinem Pheophytin a, jedoch wiesen die Quotienten S:L (vergl. Tab. 27) Unterschiede auf. Für Pheophytin a lag dieser bei 2.00, während das Verhältnis von S:L für die pheophytinisierten Produkte X 2.48 betrug.

Dünnschichtchromatographie

Beim Einsatz des Dünnschichtsystems 3 zeigte sich, daß bei der Pheophytinisierung der Produkte X, neben Pheophytin a ($R_f = 0.21$, vergl. Abb. 14) noch geringe Mengen der relativ polaren, fluoreszierenden Verbindungen A ($R_f = 0.63$) und B ($R_f = 0.20$) entstanden waren (vergl. Tab. 27). Insbesondere B war nur schwach erkennbar und von Pheophytin a nur unzureichend getrennt.

Bei A handelte es sich um Pheophorbid a, was durch die gleiche Retentionszeit von authentischem Material geschlossen werden konnte (vergl. Abb. 17). Mit System 3 konnte ferner noch ein nichtfluoreszierendes Produkt C mit einem R_f -Wert von 0.10 nachgewiesen werden.

Im Vergleich zum reversed phase System 3 wiesen die Produkte auf Kieselgel (System 4) ein entsprechendes umgekehrtes Laufverhalten auf. Die folgenden 3 Verbindungen konnten eindeutig erkannt werden: Pheophorbid a ($R_f = 0.52$), Pheophytin a ($R_f = 0.65$) sowie eine nichtfluoreszierende Verbindung ($R_f = 0.68$).

HPLC

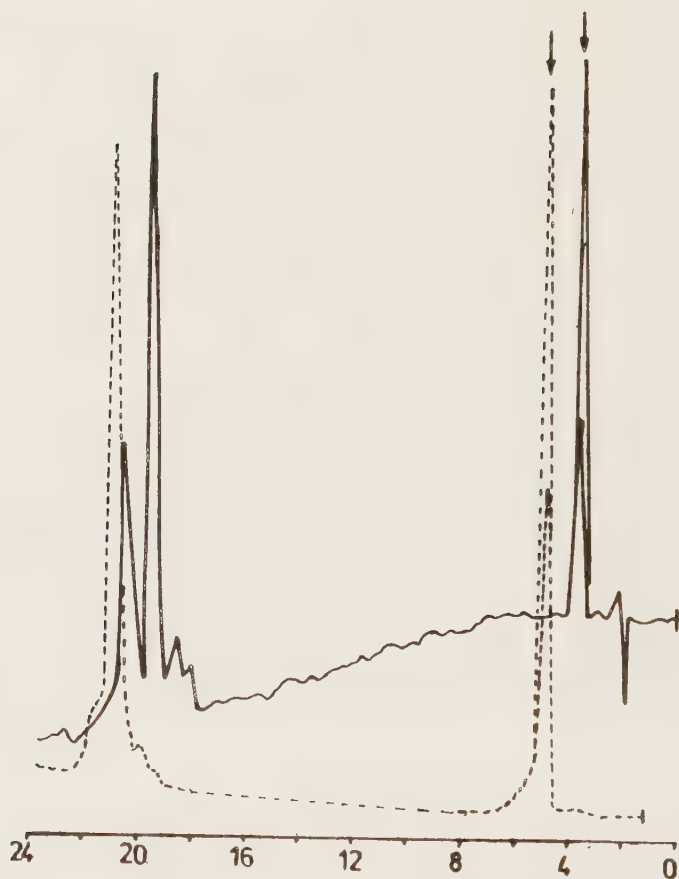


Abbildung 17: HPLC-Elutionsdiagramm von NO_x -begastem und anschließend pheophytinisiertem Chlorophyll a (System 1). (Pfeil : Zugabe von Pheophorbide a) Die Verstärkung, mit der das Diagramm aufgenommen wurde, ist in Klammern angegeben
 (—): Absorption bei 656 nm
 (----): Fluoreszenz > 600 nm

Aus dem HPLC-Elutionsdiagramm geht deutlich hervor, daß bei der Pheophytinisierung von nitritbegastem Chlorophyll a hauptsächlich wieder Pheophytin a entstanden ist. Daneben waren noch 2 weitere Produkte mit Retentionszeiten von 3.7 und 21 min. zu erkennen. Durch Zumischen von Pheophorbid a konnte die bei 3.7 min. eluierte Komponente als solches identifiziert werden. Die Substanz mit einer Retentionszeit von 21 min. fluoreszierte nicht und wurde daher als neuartiges NO_x-spezifisches Pheophytinderivat betrachtet.

Phasentest nach Molisch (1896)

Der Phasentest nach Molisch wurde zunächst mit einer begasten Probe durchgeführt. Dabei stellte man eine Braunfärbung der KOH-Phase fest.

Führte man den Test mit reinem Chlorophyll a durch, so färbte sich die Wasserphase grün. In beiden Fällen konnte eine Entfärbung der Etherphase festgestellt werden.

Tabelle 27: Spektroskopische und chromatographische Eigenschaften der NO_x -spezifischen Abbauprodukte X im Vergleich zu Chlorophyll a

	Produkte X	Chlorophyll a
nichtpheophytinisierte ----- Probe -----		
Lage der Absorptions- maxima ¹⁾	431/672	434/669
S : L	2.0	1.29
R_f -Werte (System 3)	0.40, 0.43, 0.4	0.29
Retentionszeiten (min) (System 1)	8, 11, 13	15
pheophytinisierte Probe -----		
Lage der Absorptions- maxima ²⁾	409/667	409/667
S : L	2.48	2.00
R_f -Werte (System 3)	0.13	0.21
R_f -Werte (System 4)	0.68	0.65
Retentionszeiten (min) (System 1)	20 -21	19 - 20

1) in Triton

2) in Ether

4.2.1.4 Begasung von Chlorophyll a mit SO_2

Absorptionsspektrum: vergl. Abb. 9

Die Lage der Absorptionsmaxima verschob sich erst bei relativ hohen Konzentrationen von SO_2 , u. z. von 434 auf 429 nm sowie von 669 auf 659 nm. Der Quotient S : L stieg bei der angewendeten Gaskonzentration von 1.29 auf 1.80 (Soretbande bei 429 nm).

Dünnschichtchromatographie und HPLC

Dünnschichtchromatogramm: Vergl. Abb. 14

HPLC

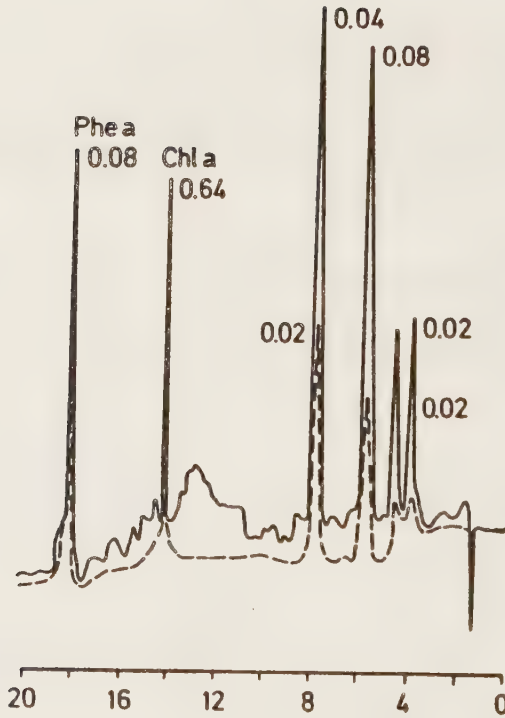


Abbildung 18: Elutionsdiagramm (System 1) der Abbauprodukte von Chlorophyll a nach Begasung mit 50 ppm SO_2

Zum Vergleich sind die Reaktionsprodukte der Lichtbegasung miteingezeichnet.

Die Verstärkung, mit der das Diagramm aufgenommen wurde, ist in Klammern angegeben.

(—): Begasung im Dunkeln

(---): Begasung im Licht Detektion bei 656 nm

Bei der Einwirkung von SO_2 auf Chlorophyll a traten ab ca. 30 ppm die Produkte Z auf (vergl. Abb. 10). Das Dünnschichtchromatogramm zeigt 2 distinkte Flecken mit R_f -Werten von 0.85 bzw. 0.80 sowie einen unscharfen Fleck, dessen R_f -Wert bei 0.70 lag.

Mittels HPLC (System 1) konnten 4 Substanzen mit Retentionszeiten von 4, 5, 6 und 8 min. getrennt werden. Ihr Verhältnis zueinander betrug 1:1:10:6. Diese Verbindungen wurden als Z bezeichnet. Außerdem war noch Edukt sowie Pheophytin a zu erkennen.

Die Produktqualität war nicht vom Einfluß des Lichtes abhängig, allerdings fand im Licht ein starkes Ausbleichen der entstandenen Verbindungen statt.

Die prozentuale Aufteilung des Reaktionsgemisches ließ sich aus dem Elutionsdiagramm (Abb. 18) wie folgt festlegen: Edukt: 50%, Pheophytin a: 16%, Produkte Y: 32%. Im Gegensatz zur Stickoxidbegasung war mit SO_2 keine quantitative Umsetzung der eingesetzten Pigmentmenge zu erreichen, sondern es trat bereits vorher eine Pheophytinisierung des Pigments ein (vergl. Abb. 5).

4.2.1.5 Begasung von Chlorophyll a mit einem Gemisch von SO_2 und NO_x

Bei der Mischbegasung entstanden dieselben Produkte wie bei den Einzelbegasungen (vergl. 4.2.1.1 - 4.2.1.4) daher soll an dieser Stelle nur noch eine kurze Erläuterung einiger Besonderheiten stattfinden.

Absorptionsspektrum

Bis zu einer Konzentration von 15 ppm SO_2 /20 ppm NO_x war keine Verschiebung der Maxima zu beobachten, danach änderte sich die Lage der Soretbande; sie verschob sich um 8 nm nach kürzeren Wellenlängen, während sich die Lage des langwelligen Peaks nicht änderte. Der Quotient S:L nahm wie bei der Begasung mit den Einzelkomponenten zu. Bei ca. 30 ppm SO_2 /50 ppm NO_x betrug er 2.02.

Dünnschichtchromatographie

Die Produkte Z traten in dem schmalen Konzentrationsbereich von 4 - 5 ppm SO_2 / 6-8 ppm NO_x deutlich auf und wurden mit zunehmenden Gasmengen schwächer. Hier überwog offenbar der Einfluß von NO_x , da die nichtfluoreszierenden Verbindungen X als Hauptkomponenten sichtbar waren.

4.2.1.6 Begasung von Thylakoiden und Hafer mit SO_2 sowie mit SO_2/NO_x

Die Begasung von Thylakoiden und Hafer mit SO_2 lieferten qualitativ dieselben Reaktionsprodukte Z (vergl. Abb. 14, Spur B), allerdings mußte zur Erzeugung dieser Verbindungen in Pflanzen eine erheblich größere Gasdosis eingesetzt werden.

Bei der Begasung mit SO_2/NO_x erhielt man sowohl die Verbindungen X (Y) wie Z. Die Schwellenwerte für die Entstehung dieser Produkte in Thylakoiden und Pflanzen sind in Tabelle 28 angegeben.

Bei der Dunkelbegasung von Chlorophyll a mit NO_x entstanden die nichtfluoreszierenden Produkte $X_1 - X_3$.

Die Reaktion mit SO_2 führte zu den Verbindungen Z. Eine quantitative Umsetzung wurde im Gegensatz zu NO_x mit SO_2 nicht erreicht, sondern es trat bereits vorher eine Pheophytinisierung ein.

Die Mischbegasung lieferte sowohl X wie Z, allerdings erhielt man die Verbindung Z nur bei niedrigen Gaskonzentrationen. Bei einer höheren Schadstoffbelastung überwog der Einfluß von NO_x , und es kam zu einer quantitativen Umsetzung von Chlorophyll a zu X. Der Quotient S:L nahm mit steigender Gaskonzentration zu. Dies galt insbesondere für NO_x und SO_2/NO_x , was dem niedrigeren Schwellenwerten (vergl. Tab. 28) dieser Gase im Vergleich zu SO_2 entsprach.

Sowohl Thylakoide wie Hafer lieferten bei der Begasung mit SO_2 , mit NO_x sowie mit SO_2/NO_x ebenfalls die Verbindungen X (Y) und Z analog der Behandlung von reinem Chlorophyll mit dem entsprechenden Gas bzw. Gasmisch. Hier fand jedoch in keinem Fall eine quantitative Umsetzung statt.

4.2.2 Begasungen im Licht

4.2.2.1 Begasung von Chlorophyll a und Thylakoiden mit SO_2 , NO_x sowie mit SO_2/NO_x

Nach einer 2-stündigen Begasung von Chlorophyll a und von Thylakoiden bei 1000 Lux ergaben sich im Vergleich zur Dunkelbegasung keine qualitativen Änderungen.

Die verkürzte Reaktionszeit erforderte jedoch im Vergleich zur 18-stündigen Dunkelbegasung für eine quantitative Umsetzung von Chlorophyll a eine deutlich höhere Stickoxidkonzentration; sie lag bei ca. 400 ppm. Bei der Begasung unter Lichtausschluß waren hierzu nur 50 ppm nötig.

Mit SO_2 wurde auch unter dem Einfluß von Licht keine quantitative Umsetzung erreicht, jedoch war hier ein relativ

starker Ausbleicheffekt der Produkte zu beobachten (vergl. Abb. 18). Genaue Untersuchungen zur Lichtempfindlichkeit der Produkte wurden nicht durchgeführt, vielmehr konzentrierte man sich auf das Auffinden der Verbindungen X (Y) und Z in Pflanzen unter Lichteinfluß.

Aus diesem Grund legte man zunächst Schwellenwerte für ihr erstmaliges Auftreten bei Verwendung von isoliertem Pigment sowie von Thylakoiden fest und testete anschließend erst die Bedingungen für die Entstehung dieser Spezies in verschiedenen Pflanzenarten. Auf Grund der beobachteten Pigmentzerstörung unter Licht und Schadstoffeinfluß bei längeren Begasungszeiten wurde die Expositionsdauer bei sämtlichen Versuchen zur qualitativen Pigmentanalytik mit intakten Pflanzen wiederum auf 2 Stunden begrenzt.

Tabelle 28: Schwellenwerte in ppm für das Auftreten der Produkte X bzw. Z mit isoliertem Chlorophyll a sowie mit Thylakoiden nach einer 2-stündigen Begasung bei 1000 Lux

Produkt	begastes Material	Schadgas		
		SO ₂	NO _x	SO ₂ /NO _x
X, nicht fluoreszierend	Chlorophyll a	-	4	3/5
	Thylakoide	140		3/5
Z, polares Pigment	Chlorophyll a	30	-	6/10
	Thylakoide	200	-	12/20

4.2.2.2 Begasung von β -Carotin mit NO_x

Absorptionsspektrum

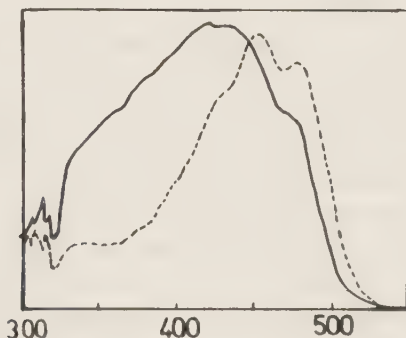


Abbildung 19: Absorptionsspektrum von β -Carotin nach einer 2-stündigen Begasung mit 10 ppm NO_x bei 1000 Lux.

(---): vorher

(—): nachher

Das Absorptionsspektrum ließ einen zunehmenden Verlust der Feinstruktur sowie eine Verschiebung des Maximums von 452 nach 430 nm erkennen. Diese Degradationserscheinungen sowie die einsetzende Peakverschiebung wurden erstmalig bei einer Gaskonzentration von 4 ppm beobachtet.

Dünnschichtchromatographie und HPLC

Das Dünnschichtchromatogramm (System 3) zeigte neben β -Carotin nur Spuren wenig charakteristischer Verbindungen, die auf Grund ihres Laufverhaltens im Vergleich zum Edukt als etwas polarer eingestuft werden konnten. Diese Reaktionsprodukte waren im HPLC-Elutionsdiagramm deutlicher

zu erkennen; daher soll an dieser Stelle nur dieses abgebildet werden.

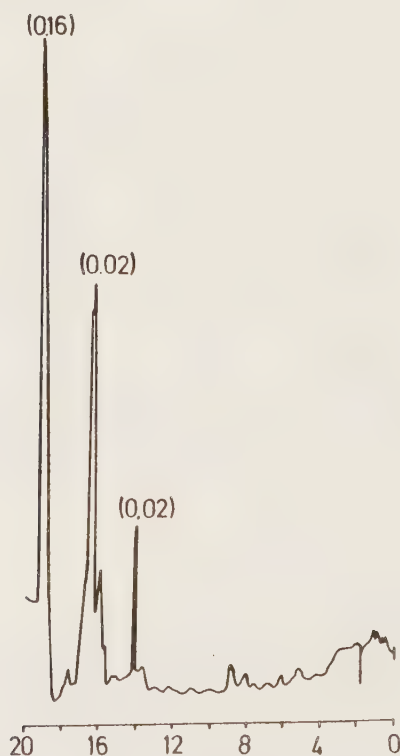


Abbildung 20: HPLC-Elutionsdiagramm (System 2) von β -Carotin nach einer 2-stündigen Begasung mit 10 ppm NO_x bei 1000 Lux
(Die Verstärkung ist in Klammern über den Peaks angegeben).

Abbildung 20 zeigt die im Vergleich zum β -Carotin polareren Degradationsprodukte zwischen 15 und 18 min.. Da diese Verbindungen allerdings auch in Spuren in der unbegasen Kontrolle auftauchten, wurden sie als Artefakte betrachtet.

4.2.2.3 Begasung von β -Carotin mit SO_2/NO_x

Während das Absorptionsspektrum von β -Carotin auch nach der Begasung mit 100 ppm SO_2 noch keinerlei Degradationserscheinungen zeigt, ist bei der Mischbegasung analog der Begasung mit reinem NO_x ein Verlust der Feinstruktur (vergl. Abb. 19) zu erkennen, verbunden mit einer Verschiebung des Maximums um 8 nm nach kürzeren Wellenlängen.

Diese Beobachtungen konnten bei der Mischbegasung erstmalig bei Konzentrationen von 0.8 ppm SO_2 /1.2 ppm NO_x gemacht werden.

Dünnschichtchromatographie und HPLC

Weder bei der Begasung mit SO_2 noch bei der Mischbegasung konnten neue, schadstoffspezifische Produkte detektiert werden. Es waren lediglich die bereits erwähnten Degradationsprodukte sichtbar, die auch in der unbegasen Kontrolle auftauchten. Auf eine Abbildung der Elutionsdiagramme wurde daher verzichtet.

Die Vorversuche mit reinem β -Carotin ergaben keine Hinweise darauf, daß unter den gewählten Versuchsbedingungen neuartige, schadstoffspezifische Derivate zu erwarten sind. Aus diesem Grund wurde bei den Pflanzenbegasungen, die im Labor durchgeführt wurden, von weiteren qualitativen Analysen der Carotinoide abgesehen.

4.2.2.4 Begasungen von Pflanzen

Begasung von Hafer mit SO_2 , NO_x und SO_2/NO_x

Absorptionsspektrum

Die Absorptionsspektren der Extrakte begaster Pflanzen zeigten keine Peakverschiebung und wurden daher nicht zur Detektion entstandener Abbauprodukte eingesetzt.

Dünnschichtchromatographie

Die Begasung von Hafer lieferte, unabhängig von den Lichtverhältnissen, dieselben Produkte wie die Begasung von Thylakoiden. Es gilt daher Abbildung 14 Spur B, C.

Für die Mischbegasung trafen ebenfalls die Aussagen zu, die bereits bei den Versuchen mit Thylakoiden gemacht wurden (vergl. 4.2.2.1).

Der Lichteinfluß spielte bei der Produktbildung keine Rolle; es entstanden wiederum hauptsächlich die Produkte X (Y) und Z, wobei auch hier die Verbindungen X überwogen.

Tabelle 29: Prozentuales Verhältnis von Produkt zu Gesamtchlorophyll P:ΣChl nach einer 2-stündigen Begasung von Hafer mit verschiedenen Konzentrationen NO_x bei 1000 Lux

ppm NO_x	P:ΣChl
200	1.94
500	14.00
700	12.50

Tabelle 29 beweist, daß der Stoffumsatz in Haferpflanzen selbst bei derart hohen Stickoxidkonzentrationen sehr gering ausfiel. Im Vergleich zur Dunkelbegasung zeigten sich keine qualitativen Unterschiede, was wiederum auf eine lichtunabhängige Reaktion schließen läßt.

Durch den Einsatz anderer Pflanzenarten sollte daher geprüft werden, ob mit einem ubiquitären Auftreten der Abbauprodukte X (Y) und Z gerechnet werden konnte und ob dies ggf. bereits bei geringeren Schadstoffdosen als den oben aufgeführten sowie mit größeren Ausbeuten möglich war.

Begasung von Tamariskenmoos, Fichte und Linde mit SO_2 , NO_x sowie mit SO_2/NO_x

Dünnschichtchromatographie und HPLC

Mittels Dünnschichtchromatographie konnte bewiesen werden, daß in allen getesteten Pflanzen dieselben Reaktionsprodukte auftraten. Diese Verbindungen wurden bereits in Abbildung 14 dargestellt.

Bei der Ermittlung der Schwellenwerte mittels DC und HPLC ergaben sich für die einzelnen Spezies nur geringe Unterschiede. Die Moosproben, von denen der eine Teil bereits vor der Begasung einer sauren Beregnung unterzogen worden war und der andere Teil neben dieser Beregnung noch eine Calcium/Magnesiumdüngung erfuhr, zeigten im Vergleich zu einer völlig unbehandelten Kontrollgruppe keinerlei Unterschiede in den Schwellenwerten.

Tabelle 30: Schwellenwerte in ppm für das Auftreten von Abbauprodukten in verschiedenen Pflanzenarten nach einer 2-stündigen Begasung bei 1000 Lux

Produkt	begastes Material	Schadgas		
		SO ₂	NO _x	SO ₂ /NO _x
X, nichtfluoreszierend (Y)	Tamariskenmoos	200	140/200	
	Hafer	500	350/500	
	Fichte	500	1000/500	
	Linde	500	350/500	
Z, polares Pigment	Tamariskenmoos	300	140/140	
	Hafer	700	350/500	
	Fichte	700	1000/700	
	Linde	700	500/350	

Bei der Begasung von Chlorophyll, Thylakoiden und Pflanzen mit SO₂, NO_x sowie mit SO₂/NO_x entstanden unabhängig von den Lichtverhältnissen jeweils die gleichen schadstoffspezifischen Produkte X (Y) und Z.

Zu bemerken war, daß diese Verbindungen unabhängig von der Pflanzenart in allen eingesetzten Proben auftraten, wobei der Schwellenwert nur wenig schwankte. Lediglich Moos erwies sich als ca. doppelt so empfindlich wie das übrige Material. Eine Vorbehandlung der Pflanzen in Form einer sauren Beregnung bzw. einer zusätzlichen Düngung hatte jedoch keinerlei Auswirkungen auf die Empfindlichkeit.

Unter den geprüften Pflanzenarten befand sich somit keine, bei der auch beim Einsatz umweltrelevanter Gasdosen noch mit dem Auftreten schadstoffspezifischer Abbauprodukte gerechnet werden konnte.

4.3 Freilanduntersuchungen

Chlorophyllgehalt

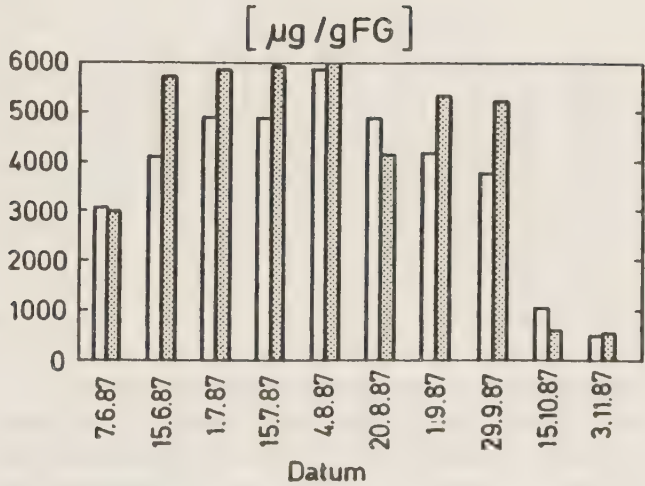


Abbildung 21: Gesamtchlorophyllgehalt ($\mu\text{g/g Fg}$) in Blättern von Linden zweier verschiedener Standorte in München

□ Effnerplatz

▨ Hirschgarten

Tabelle 31: Jahreszeitlicher Verlauf des Quotienten
Chlorophyll a/ Chlorophyll b in Lindenblättern

Datum	Standort	
	Effnerplatz	/Hirschgarten
7.6. 87	2.86	3.13
15.6. 87	2.60	2.66
1.7. 87	3.23	2.78
15.7. 87	2.95	3.92
4.8. 87	3.24	2.98
20.8. 87	3.01	2.66
1.9. 87	2.67	2.34
29.9. 87	4.20	2.82
15.10.87	3.01	2.26
3.11.87	3.13	2.58

In Abbildung 21 läßt sich zunächst für die Proben beider Standorte ein gleicher jahreszeitlicher Verlauf der Chlorophyllzu- bzw. -abnahme feststellen.

Der Pigmentgehalt erreichte Anfang August sein Maximum und fiel dann verhältnismäßig schnell wieder ab. Ferner ist die Tendenz erkennbar, daß der Chlorophyllgehalt der Proben des Standortes Effnerplatz i. allg. niedriger lag, als in Pflanzenmaterial, das aus dem geringer belasteten Gebiet Hirschgarten stammte.

Das Chlorophyll a/Chlorophyll b-Verhältnis zeigte, insbesondere in den Sommermonaten keine signifikanten standortbedingten Differenzen. Im Herbst wies das stärker NO_x-exponierte Material (Effnerplatz) den größeren Quotienten auf, was unter Berücksichtigung der aus Abbildung 21 gewonnenen Ergebnisse auf einen verstärkten Abbau von Chlorophyll b schließen läßt.

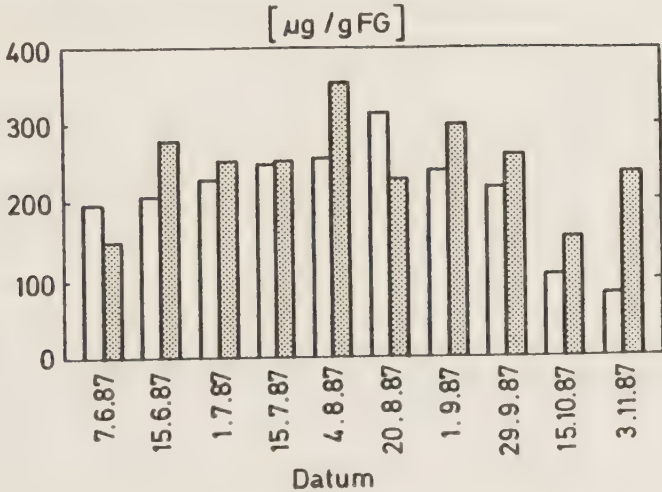
Xanthophyllgehalte und β -Carotingehalt

Abbildung 22: Gesamt-xanthophyllgehalt ($\mu\text{g} / \text{g Fg}$) der Blätter von Linden zweier unterschiedlicher Standorte in München

☐ Effnerplatz
 ☒ Hirschgarten

Tabelle 32: Verhältnis β -Carotin/Gesamtchlorophyll (Car/Chl) in Lindenblättern zweier verschiedener Standorte in München

Datum	Standort	
	Effnerplatz	Hirschgarten
7.6. 87	0.20	0.19
15.6. 87	0.18	0.18
1.7. 87	0.21	0.19
15.7. 87	0.18	0.15
4.8. 87	0.14	0.25
20.8. 87	0.15	0.12
1.9. 87	0.22	0.15
29.9. 87	0.27	0.17
15.10.87	0.24	0.19
3.11.87	0.25	0.29

Ein Vergleich der Daten aus Abbildung 21 und Tabelle 32 zeigt, daß der absolute β -Carotingehalt während des Untersuchungszeitraumes relativ unverändert blieb. Das Absinken des Quotienten Car/Chl im Juli/August auf ein Minimum konnte auf den Chlorophyllanstieg während dieser Zeit zurückgeführt werden (Abb. 21) und auch der Anstieg des Quotienten im Herbst wurde hauptsächlich durch den starken Abfall des Chlorophyllgehaltes verursacht.

Auf Grund dieser Tatsache wählte man β -Carotin als Bezugsgröße für die Xanthophylle und betrachtete weiterhin nur noch relative Mengenverhältnisse von Pigmenten.

Der absolute Xanthophyllgehalt ließ ebenfalls eine jahreszeitliche Zu- und Abnahme erkennen. Im Vergleich zum Chlorophyllgehalt waren diese Schwankungen jedoch bei den Xanthophyllen weniger stark ausgeprägt. Vor allem im Herbst verlief die Degradation der Carotinoidpigmente offenbar

weitaus langsamer als die der Chlorophylle.

Über den Gesamtxanthophyllgehalt läßt sich noch folgende Feststellung machen:

Im Frühjahr setzte sich dieser neben Lutein noch aus Violaxanthin sowie aus Neoxanthin zusammen. Im Herbst wurde besonders letzteres Pigment verstärkt abgebaut, dafür nahmen der Anteil an Antheraxanthin bzw. Luteinepoxid zu.

Die standortlich bedingten Schwankungen im Gesamtxanthophyllgehalt zeigten dieselben Tendenzen wie die der Chlorophylle. Die Proben des weniger belasteten Standortes Hirschgarten zeigten i. allg. mehr Pigment als das Pflanzenmaterial, das einer relativ hohen NO_x -Exposition ausgesetzt war. Diese Unterschiede waren gegen Ende des Untersuchungszeitraumes noch etwas deutlicher ausgeprägt als zu Beginn (vergl. Abb. 21, 22).

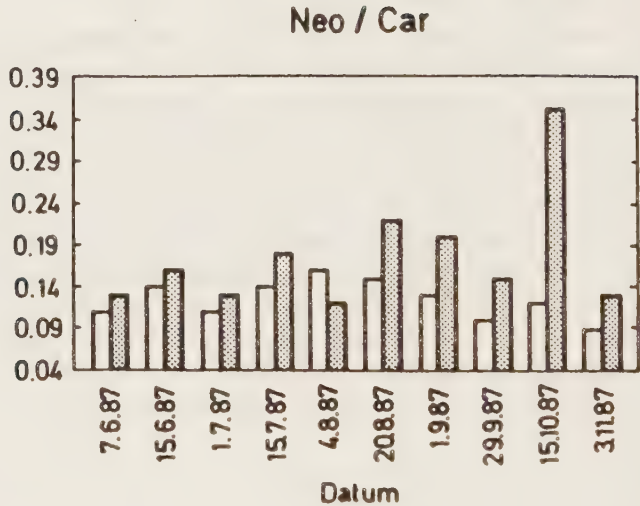
Neoxanthin/ β -Carotin (Neo/Car)

Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf des Quotienten Neoxanthin/ β -Carotin in Linden von zwei Standorten in München

□ Effnerplatz ▨ Hirschgarten

Der Neoxanthingehalt zeigte bis Mitte August gegenüber den Frühjahrswerten eine Zunahme um ca. 50%. Durch die anschließende Abnahme im Herbst wurde in etwa wieder die Ausgangskonzentration vom Frühjahr erreicht.

Die Pigmentgehalte beider Standorte unterschieden sich in der ersten Hälfte der Vegetationsperiode nur wenig, sie nahmen aber im Herbst zu, wobei das Gebiet Hirschgarten immer den größeren Quotienten Neo/Car aufwies.

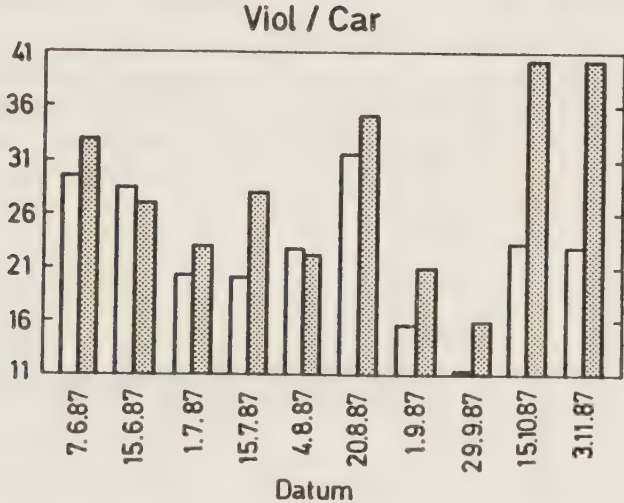
Violaxanthin/ β -Carotin (Viol/Car)

Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf des Quotienten Viol/Car in Linden von zwei verschiedenen Standorten in München

□ Effnerplatz ▨ Hirschgarten

Violaxanthin verhielt sich im Verlauf des Untersuchungszeitraumes offenbar weniger einheitlich. Die saisonalen Konzentrationen zeigten einen sinusförmigen Verlauf mit Maxima Anfang Juni sowie Mitte August. Im Herbst schien dieses Pigment nur langsam abzunehmen, da auch hier nochmals ein relativer Anstieg zu verzeichnen war.

Gegen Ende des Untersuchungszeitraumes lassen sich auch standortliche Unterschiede erkennen: der Pigmentgehalt in den Proben vom Effnerplatz war nur etwa halb so hoch wie in denen des Gebietes Hirschgarten.

Antheraxanthin/ β -Carotin (Ant/Car) bzw. Luteinepoxid/ β -Carotin (LuE/Car)

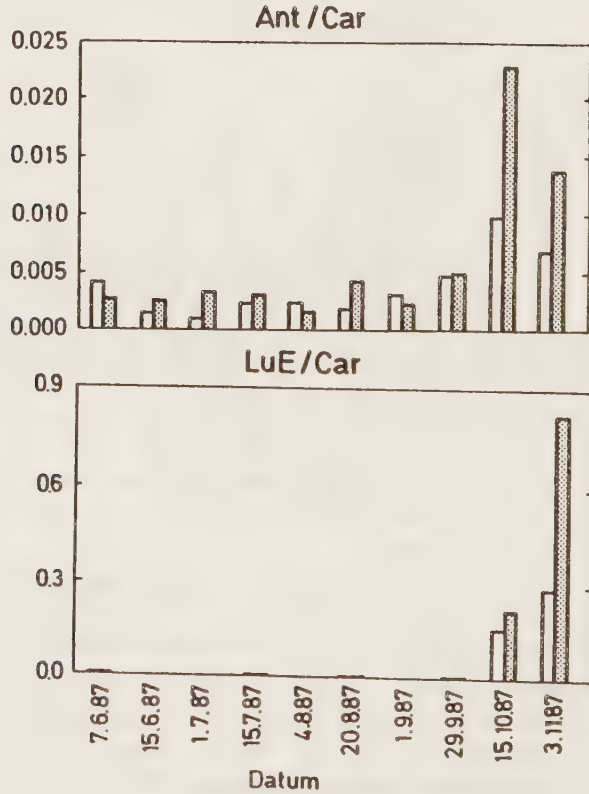


Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf des Quotienten Ant/Car bzw. LuE/Car in Linden zweier verschiedener Standorte in München

□ Effnerplatz

▣ Hirschgarten

Antheraxanthin und Luteinepoxid zeigten beide einen charakteristischen Anstieg im Herbst. Ihr Anteil am Gesamt-xanthophyllgehalt war allerdings immer noch sehr gering. Er betrug für Luteinepoxid am Effnerplatz 6% sowie im Hirschgarten 3%. Für Antheraxanthin ergaben sich Werte von 0.16% bzw. 0.12%. Auch hier war wiederum der Quotient der Proben aus der weniger belasteten Zone größer.

Lutein/ β -Carotin (Lu/Car)

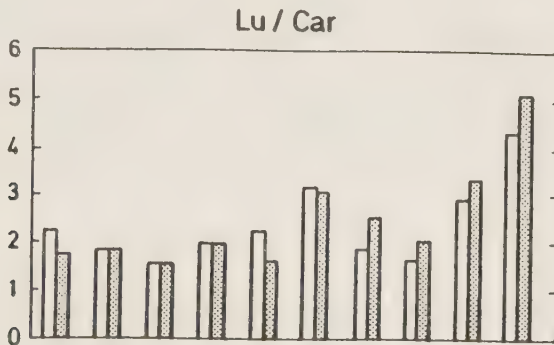


Abbildung 26: Zeitlicher Verlauf des Quotienten Lu/Car in Linden zweier verschiedener Standorte in München

□ Effnerplatz ▨ Hirschgarten

Die Luteinkonzentration zeigte fast in der gesamten Vegetationsperiode weder standortliche noch saisonale Unterschiede. Lediglich im Herbst trat eine etwas stärker ausgeprägte Differenz zwischen den beiden Standorten auf.

Insgesamt ergaben sich bei den quantitativen Pigmentvergleichen von Lindenblättern der beiden unterschiedlich stark NO_x -belasteten Standorte Hirschgarten und Effnerplatz folgende Befunde:

Die Pigmentkonzentrationen zeigten während der Sommermonate kaum standortlich bedingte Differenzen, erst im Herbst gewannen diese Unterschiede an Gewicht, wobei das Pflanzenmaterial aus der weniger belasteten Zone i. allg. die höheren Pigmentgehalte aufwies.

Der saisonale Verlauf des Pigmentgehaltes war für beide Standorte derselbe und zeigte in der Regel eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Zunahme bis ca. August, auf die eine entsprechende Abnahme bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes folgte.

β -Carotin und Lutein wiesen die geringsten saisonbedingten Konzentrationsunterschiede auf, während der Chlorophyllgehalt relativ starken jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen war.

5 Diskussion

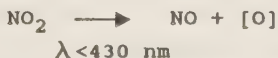
5.1 Quantitative Pigmentanalysen

5.1.1 Begasung von reinem Chl a und Thylakoiden

5.1.1.1 Mit NO_x

NO_x verursachte bei freiem Chlorophyll eine relativ rasch einsetzende Ausbleichung. Dieser Effekt ist auf die oxidierende Wirkung der Stickoxide zurückzuführen (Heath 1980). Seine Eigenschaft als schwache Säure kam erst bei einer Konzentration von 500 ppm zum Tragen und verursachte eine Pheophytinisierung des Pigments (vergl. Abb. 5).

Unter dem Einfluß von Licht erwartet man auf Grund der folgenden möglichen Radikalreaktion (Elstner 1984)



durch den dabei entstehenden atomaren Sauerstoff einen noch drastischeren Bleicheffekt.

Auch in den hier durchgeführten Versuchen ließ sich bei Belichtung ein größerer Bleicheffekt feststellen als im Dunkeln. Bei einer Begasungszeit von nur 2 Stunden entsprachen die Pigmentverluste in etwa denen der 18-stündigen Dunkelreaktion.

Zu beachten ist jedoch, daß sichtbares Licht, unter dem die Versuche durchgeführt wurden, nur einen geringen Prozentsatz der UV-Strahlung enthält, die zum Ablauf der oben beschriebenen Reaktion erforderlich ist.

Somit muß davon ausgegangen werden, daß der Anteil an atomarem Sauerstoff unter den gewählten Versuchsbedingungen sehr gering war und daß demnach die beobachtete Pigmentaushleichung nicht ausschließlich auf dieser Reaktion basierte. Eine signifikante Bleichwirkung setzte zwischen 5 und 10 ppm

NO_x ein, und zwar unabhängig von den Lichtverhältnissen. Diese Beobachtung kann damit erklärt werden, daß sich zunächst im Gasraum eine Mindestsättigungskonzentration einstellen mußte, bevor signifikante Mengen an Stickoxiden in die Pigmentlösung übergingen. Aus einem Testversuch ging hervor, daß sich bei einer Dosis von 500 ppm NO_x 3% - 5% der Gasmenge in der flüssigen Phase löste. Da die Gaskonzentration in der Lösung nicht bestimmt wurde, bezog man alle Konzentrationsangaben auf den Gasraum, allerdings muß man sich bewußt sein, daß die aktuelle Menge an Gas in der Pigmentlösung weitaus geringer war als die angegebenen Werte. Ein Unsicherheitsfaktor in der exakten Bestimmung der Konzentration im Gasraum war die Annahme, daß sowohl die Umsetzung des Salzes in das entsprechende Gas wie auch dessen Übergang aus der wässrigen Säurelösung in die Gasphase immer quantitativ verlief.

Unklar ist ferner die tatsächliche Zusammensetzung des Gemisches NO_x . Das nach 2.10.1. hergestellte Gas enthielt die Komponenten NO und NO_2 , wobei NO in einer Folgereaktion zu NO_2 reagierte. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion mit Luftsauerstoff ist in Abwesenheit von Photooxidantien und bei niedrigen Konzentrationen NO verhältnismäßig langsam (Rowland et al. 1985). So beträgt beispielsweise der Anteil an NO_2 in Reinluftgebieten nur 50% (Martin und Barber 1984). Die in diesen Experimenten angewendeten Gaskonzentrationen übertrafen jedoch die umweltrelevanten Dosen (vergl. Tab. 3) bei weitem. Außerdem ist die Löslichkeit von NO_2 in einem wässrigen Medium besser als die von NO (Nash 1970), sodaß man davon ausgehen kann, daß die Pigmentaushleichung hauptsächlich durch NO_2 verursacht wurde.

Somit läßt sich feststellen, daß freies Chlorophyll mit und ohne Lichteinfluß von NO_x angegriffen wurde, wodurch es zunächst zu einer Pigmentaushleichung kam. Die Reaktion im Licht verlief jedoch auf Grund weiterer, nicht näher untersuchter Bleicheffekt weitaus schneller als im Dunkeln. Im Gegensatz hierzu war der Einfluß von NO_x auf gebundenes

Chlorophyll weniger ausgeprägt (vergl. Abb. 6). Die Thylakoidmembran kann aufgrund ihres unpolaren Charakters nicht in dem verwendeten Phosphatpuffer gelöst werden (vergl. 2.9) (Helenius und Simons 1975). Diese Tatsache verhinderte zunächst den direkten Angriff der Gase auf das Pigment, denn die relativ polaren Gasmoleküle sind nur bedingt in der Lage, eine unpolare Barriere zu passieren (Elstner 1984).

Genau an dieser Stelle kann zunächst ein oxidativer Lipidabbau stattfinden (Heath 1980), da die Thylakoidmembran einen hohen Anteil an ungesättigten Fettsäuren enthält (Anderson 1983). Erst in einer Sekundärreaktion kommt es dann zur Pigmentausbleichung (Schmidt und Kuhnert 1986, Imamura und Shimizu 1974, Lüthy et al. 1986). Beim Vergleich von Abbildung 6 und Tabelle 7 stellt man fest, daß deren Geschwindigkeit bei einer Lichtintensität von 1000 Lux im Vergleich zur Dunkelreaktion nur wenig gesteigert war.

Die teilweise Abreaktion des Gases an der Thylakoidmembran erklärt auch die im Vergleich zum Reinpigment höheren Schwellenwerte. Beim Einsatz einer Detergenslösung sollte eine Solubilisierung der Thylakoidmembran sowie des gebundenen Pigments erfolgen (Helenius et al. 1979) und man würde ein Absinken des Schwellenwertes auf das Niveau der Gaskonzentrationen erwarten, die bei der Begasung von reinem Chlorophyll a zum Einsatz kamen. Diese Behauptung bedarf jedoch noch einer Überprüfung, da ein derartiges Experiment nicht durchgeführt wurde.

5.1.1.2 Mit SO_2

Die Bleichwirkung von SO_2 auf freies Chl a war im Vergleich zu NO_x weniger ausgeprägt. Unabhängig von den Lichtverhältnissen zeigten sich hier über weite Bereiche zunächst keinerlei Pigmentabnahmen. Die geschilderte Beobachtung läßt sich auf die reduzierende Wirkung von SO_2 zurückführen. Puckett et al. (1973) beschreiben die rasche Oxidation von Sulfit zu Sulfat bei einem pH-Optimum von 6-7, in dem auch der pH-Wert der Pigmentlösung lag. Dies könnte in den hier durchgeführten Experimenten möglicherweise dazu geführt haben, daß das in Puffer gelöste Chlorophyll zunächst vor einer oxidativen Zerstörung, wie sie bei NO_x beobachtet wurde, geschützt war. Erst bei Gaskonzentrationen ab 30 ppm, wenn die Pufferkapazität offenbar überschritten ist, setzte im Dunkeln eine starke Ausbleichung ein, die mit einem Pigmentverlust von 50% verbunden war. Bei 400 ppm trat eine Pheophytinisierung des Pigments ein, was auf eine starke Ansäuerung der Lösung hindeutet. Tatsächlich wurde auch nach beendeter Reaktion ein pH-Wert zwischen 2.0 und 2.5 gemessen. Im Licht stellte man signifikante Ausbleichraten bereits nach 2 Stunden fest. Diese könnten durch eine Radikalreaktion erklärt werden.

Kaplan et al. (1974) schildern einen alternativen indirekten Oxidationsmechanismus von gelöstem SO_2 , bei dem zunächst reaktive Sauerstoffspezies freigesetzt werden, deren pigmentzerstörende Wirkung in vitro und in vivo bereits mehrfach beobachtet wurden (Merzlyak und Kovrizhnikh 1986, 1984, Merzlyak et al. 1985, Shimazaki et al. 1980). Peiser und Yang (1977, 1978) beobachteten ebenfalls analoge Bleichreaktionen von Chlorophyll mit Bisulfit in vitro und führen dies auf eine Photooxidation des Pigments in einer Radikalreaktion zurück.

Die Kurven in den Abbildungen 6 und 8 ließen einen etwa gleichen Ausbleicheffekt von SO_2 und NO_x erkennen. Man stellte jedoch bei der Begasung von Thylakoiden mit SO_2 im

Vergleich zur Begasung des freien Pigments eine stärkere Abnahme fest.

Auch für SO_2 sind Reaktionen zwischen den Protein- und Lipidkomponenten der Membran bekannt (Brinkmann et al. 1972, Lüttge et al. 1972, Khan und Malhotra 1977), die zu relativ unspezifischen Strukturveränderungen führen (Jäger und Klein 1980). Wong et al. (1977) beschreiben beispielsweise ein Schwellen von Stromathylakoiden in Erbsenchloroplasten bereits ab 0.1 ppm SO_2 . Dieser Effekt wird jedoch auch in isolierten Thylakoiden als normale Seneszenzerscheinung beobachtet (Siegenthaler 1968, 1972) und ist mit einem lichtunabhängigen Pigmentverlust verbunden (Dupont und Siegenthaler 1986).

Bei der hier durchgeführten Begasung von isolierten Thylakoiden mit SO_2 wäre ein analoger Mechanismus denkbar. Dieser hätte dann, verglichen mit freiem Chlorophyll, ein rascheres Ausbleichen des gebundenen Pigments zur Folge.

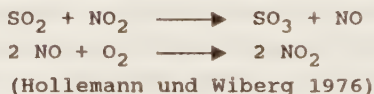
5.1.1.3 Mit SO_2/NO_x

Die Kombinationswirkung von SO_2 und NO_x wurde mit einem Gemisch der Zusammensetzung 3:5 durchgeführt (bezogen auf die in ppm angegebene Gaskonzentration), wobei man sich an den umweltrelevanten Daten orientierte, nach denen beide Gase entweder zu gleichen Anteilen vorliegen oder auch ein leichtes Überwiegen von NO_x festzustellen ist (Bell 1984). Die Auswirkungen dieses Gemisches können sowohl additiver wie synergistischer Natur sein (Omrod 1982). Wellburn et al. (1981) schildern synergistische Auswirkungen auf Enzymaktivitäten, während Wachstum und Photosynthese entweder synergistisch oder additiv beeinflussbar sind (Whitmore und Freer-Smith 1982, Omrod 1982).

Bezüglich der Bleichwirkung konnte bei niedrigen Gaskonzentrationen SO_2/NO_x zunächst kein Synergismus festgestellt werden. Dies ist wahrscheinlich wiederum auf

die bereits erwähnte Sättigungskonzentration im Gasraum zurückzuführen, die bei niedrigen Gasdosen noch nicht erreicht war und ohne die die Schadstoffkonzentration in Lösung nicht ausreichte, um eine Pigmentzerstörung zu verursachen.

Ging man zu höheren Konzentrationen über, so stellte man im Vergleich zur Begasung mit den Einzelkomponenten einen weitaus größeren Pigmentverlust fest. Dabei verhielten sich Thylakoide etwas stabiler als freies Chlorophyll (vergl. Abb. 5, 7). Als Erklärung für diese Beobachtung wäre zunächst eine Reaktion von SO_2 mit NO_2 denkbar:



Das so entstandene SO_3 löst sich unter Bildung von H_2SO_4 im Reaktionsmedium und wirkt nur noch durch seine Säurewirkung, die jedoch in dem verwendeten Tritonpuffer erst bei noch höheren Konzentrationen zum Tragen kam. Bei einer Dosis von 470 ppm NO_x und 280 ppm SO_2 wurde beispielsweise nur eine relativ geringe pH-Absenkung von 7.4 auf ca. 6.8 gemessen.

Das nach obiger Gleichung entstandene NO_2 löst sich ebenfalls in der wässrigen Pigment-Pufferlösung:



Die dabei entstandenen Solvatationsprodukte verursachen im folgenden Reaktionsschritt die oxidative Pigmentausbleichung (Carlson 1983).

Bei hohen Konzentrationen könnte die oxidierende Wirkung von NO_x sowie die Säurewirkung der entstandenen Schwefelsäure zum völligen Ausbleichen des Pigments geführt haben. Dies

käme einer synergistischen Wirkung gleich.

Führte man die Begasungen im Licht aus, so ergaben sich quantitativ die gleichen Effekte, jedoch betrugen die hierzu benötigten Reaktionszeiten nur etwa $1/9$ der Dunkelreaktionszeiten (Abb. 7, Tab. 7).

5.1.1.4 Begasung von reinem Chlorophyll a mit Ozon

Auch bei der Reaktion von Ozon mit Chlorophyll dokumentierte sich der für die Pigmentausbleichung ausschlaggebende Einfluß des Lichtes. Während im Dunkeln bei einer Gasdosis von 30 ppm Ozon ein Pigmentverlust von 20% gemessen wurde, konnte im Licht eine beträchtliche Steigerung der Ausbleichrate festgestellt werden: Sie betrug hier ca. 50% (vergl. Abb. 8).

Der Mechanismus dieser Reaktion sollte zunächst unabhängig von den Lichtverhältnissen sein, nämlich ein spontaner Zerfall von Ozon im wässrigen Medium unter Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies (Heath 1980). In der nachfolgenden 2-stündigen Inkubation kam es im Licht zu einer verstärkten Pigmentausbleichung, während unter Lichtausschluß nur ein geringer Chlorophyllverlust eintrat. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Ergebnissen, die bei der Begasung mit SO_2 und NO_x gewonnen wurden.

Abbildung 11 zeigt die Ausbleichraten von Chlorophyll im Vergleich zu β -Carotin unter Einfluß verschiedener Schadgase, jeweils bei einer Konzentration von 30 ppm. Hieraus ist ersichtlich, daß die Ausbleichraten von Chlorophyll mit den oxidativ wirkenden Schadgasen NO_x und Ozon im selben Bereich liegen.

5.1.2 Reaktionen von Chlorophyll mit Schadgasen in intakten Pflanzen

Zunächst wurde eine 18-stündige Dunkelbegasung von Haferpflanzen durchgeführt. Hierbei traten jedoch weder größere visuelle Schäden noch Pigmentabnahmen auf (vergl. Tab. 6). Zur Erklärung dieses Befundes müssen folgende Faktoren berücksichtigt werden:

Die direkte Gasaufnahme über die Blätter kann unter Lichtausschluß durch einen Stomataverschluß beeinträchtigt sein (Murray 1984, Vos und Oyarzun 1987). Unter diesen Umständen findet nur noch ein minimaler Transport auf dem weniger wichtigen Weg über die Cuticula statt (Srivastava et al. 1975, Rowland 1987). Die so aufgenommenen geringen Gasmengen führten zu keiner Schädigung der Pflanzen. Ein Chlorophyllanstieg, der bei der Begasung mit NO_x sowohl im Dunkeln wie auch im Licht (vergl. Tab. 11, 12) beobachtet wurde, ist möglicherweise auf Düngeeffekte bei mangelnder Stickstoffversorgung über das Wurzelsystem zurückzuführen.

So stellen auch Srivastava und Omrod (1984) in Versuchen mit gedüngten und ungedüngten Bohnen bei einer NO_x -Begasung in den nicht ausreichend stickstoffversorgten Pflanzen erhöhte Pigmentgehalte fest, wohingegen die gedüngte Kontrollgruppe nach der Gasexposition durchwegs weniger Gesamtpigment aufweist.

Auf Grund des erwähnten gehemmten Gastransportes über die Blätter muß auch in Anbetracht der längeren Expositionsdauer die Aufnahme über das Wurzelsystem in Erwägung gezogen werden (Yoneyama et al. 1980).

Nach Lendzian (1987) sollte man unter Lichteinfluß größere Auswirkungen erwarten.

Tatsächlich zeigten sich auch bei NO_x -exponierten Pflanzen und besonders bei der Mischbegasung mit SO_2 und NO_x im Licht größere visuelle Schäden. Die Stickoxidbegasung führte zu einer verstärkten Braunfärbung der Blattspitzen, während bei

der Kombination von SO_2 und NO_x ein Umknicken und Welken der Pflanzen zu beobachten war (vergl. 4.1.1.3).

Reinert et al. (1975) stellen bei der Begasung mit Ozon die gleichen optischen Schäden fest, die auch bei der Mischbegasung auftraten. Dies konnte in den Experimenten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, jedoch nicht bestätigt werden, denn mit Ozon traten erst 24 Stunden nach der Inkubation stärkere sichtbare Schäden auf, die sich in einem Austrocknen und gleichzeitigem Ausbleichen der Blätter (vergl. Tab. 13) manifestierten.

Allerdings standen die in dieser Arbeit gemachten Beobachtungen im Einklang mit den Ergebnissen von Krause und Prinz (1985), die bei Buchen ebenfalls erst längere Zeit nach Absetzen der Ozonbegasung vom Auftreten signifikanter optischer Schäden berichten.

Eine Kombination von Ozon mit SO_2 bzw. NO_x hatte bereits sofort nach der Begasung verstärkte Ausbleichraten zur Folge. Besonders interessant erschienen diese Beobachtungen zur Beurteilung des schädigenden Einflusses von PAN, das bei der Kombination von NO_x mit Ozon unter Lichteinfluß entstehen soll (Pitt und Finlayson 1975). Die bei der Mischbegasung mit Ozon gemessenen Ausbleichraten erreichten nicht das Ausmaß des Pigmentverlustes, der mit der Kombination von SO_2 und NO_x erzielt werden konnte (vergl. Tab. 14). Hier bedarf es jedoch noch einer Überprüfung der Daten, da die Begasungsversuche mit Ozon nur einmal durchgeführt wurden.

Auf Grund der bisherigen Beobachtungen besteht jedoch durchaus die Möglichkeit, daß Ozon in Verbindung mit mehreren Gasen schneller zu einer Pigmentschädigung führt, als die Einzelkomponenten, da ähnliche synergistische Wirkungen bereits bekannt sind. So beschreiben Guderian und Tingey (1986) das Dreiergemisch $\text{SO}_2/\text{NO}_x/\text{Ozon}$ als besonders schädigend für das Blattwachstum von Pappeln.

Die verstärkte Schadwirkung von Gasgemischen kann oft mit einer Hemmung der Enzymaktivitäten erklärt werden. Erst in

einer Folgereaktion kommt es zu den Bleichreaktionen der Photosynthesepigmente. Wellburn et al. (1981) begründen die Wirkung des Gemisches SO_2/NO_x mit dem gegensätzlichen Einfluß der Gase auf die Aktivität der Nitritreduktase. Diese wird durch NO_x allein aktiviert, jedoch bei der Kombination von SO_2 und NO_2 gehemmt, so daß die Metabolisierung der Stickoxide unterbunden wird, was zu den beobachteten Pflanzenschäden führt. Auch für Ozon ist eine Hemmung der Nitritreduktase bereits beschrieben worden (Leffler und Cherry 1974), so daß hier ein analoger Mechanismus denkbar ist.

Bei der Begasung mit SO_2 allein konnte im Licht eine leichte Pigmentzunahme festgestellt werden. Dieser Fertilisations-effekt ist ebenfalls seit langem bekannt und mehrfach beschrieben worden (Thomas et al. 1944, Faller et al. 1970, Jäger et al. 1986, Chevone et al. 1986). Bemerkenswert ist jedoch, daß diese Konzentrationserhöhung sowohl bei der Begasung mit NO_2 wie mit SO_2 bereits nach 2 Stunden auftrat. Wie bereits erwähnt, erwartete man unter dem Einfluß des Lichtes größere Ausbleicheffekte als bei der Reaktion im Dunkeln. Dies konnte jedoch mit Ausnahme der Mischbegasung bei Pflanzen nicht bestätigt werden.

Auch hier muß wieder der Öffnungsgrad der Stomata diskutiert werden, der nicht nur von den Lichtverhältnissen abhängig ist, sondern auch von den Gaskonzentrationen (Mansfield 1973). Die Literaturangaben hierüber sind jedoch nicht eindeutig: Lenzian (1987) beschreibt beispielsweise bei hohen SO_2 -Konzentrationen - was für die durchgeführten Experimenten in jedem Fall zutrifft - einen Stomataverschluß, während Schönborn und Weber (1981) eine Lähmung des Schließmechanismus und damit eine permanente Öffnung beobachten.

Der pflanzliche Organismus besitzt Schutzmechanismen (Larcher 1987), mit denen er offenbar auch einer photo-oxidativen Pigmentzerstörung durch Schadgase wirksam begegnen kann. Tabelle 15 verdeutlicht dies durch die zu-

nehmende Unempfindlichkeit der Pigmente in der Reihenfolge Chlorophyll-Thylakoide-Pflanzen. Die angegebenen Schwellenwerte für das Ausbleichen der Photosynthesepigmente in Pflanzen können allerdings nur als Richtwerte dienen. Es ist damit zu rechnen, daß sich diese Daten unter anderen Versuchsbedingungen sowie möglicherweise auch beim Einsatz anderer Pflanzenspezies ändern, da die Empfindlichkeit gegenüber Schadstoffen sehr stark von der verwendeten Art abhängt (Heath 1980).

Neben den physiologischen Schutzwirkungen, wie etwa dem Schließen der Stomata, wird bei der Einwirkung von Schadgasen auch eine Beeinflussung der Produktion von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen beobachtet, beispielsweise von Antioxidantien (Greim und Senger 1985, Mehlhorn et al. 1986) und Phenolkörpern. So stellen Alcubilla et al. (1985) bei vergilbten Fichtennadeln einen erhöhten Gehalt an Polyhydroxyphenolen fest. Ferner wird auch über einen Anstieg der Aminosäure Prolin in erkrankten Fichten (Bode et al. 1985) berichtet.

In den Begasungsversuchen mit NO_x , die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, trat bei genügend hoher Belastung regelmäßig eine Braunfärbung der Blattspitzen auf, jedoch lag der Pigmentgehalt in diesen Pflanzen nicht signifikant unter dem der Kontrollpflanzen (vergl. Tab. 11, 12). Hieraus muß geschlossen werden, daß die beschriebene Verfärbung nicht auf ein Ausbleichen zurückzuführen ist. Vielmehr käme auch hier eine Oxidation von Phenolkörpern zu Polyphenolen in Betracht, durch deren massives Auftreten die braune Farbe zustandekommt (Christen, 1977a).

Die Braunfärbung wurde nur bei einer Begasung mit NO_2 beobachtet. Somit stellt sich die Frage, ob eine erhöhte Konzentration an Phenolkörpern möglicherweise ein NO_2 -spezifisches Schadsymptom ist und zur Früherkennung von Waldschäden herangezogen werden kann.

Da sich jedoch diese Arbeit nur mit dem Verhalten der

Photosynthesepigmente unter dem Einfluß von Schadstoffen befaßte, wurde eine Lösung dieses Problems nicht angestrebt.

5.1.3 Verhalten von β -Carotin unter Schadstoffeinfluß

5.1.3.1 Freies und thylakoid-gebundenes β -Carotin

Die Reaktion der Carotinoide mit Luftschadstoffen sollte zunächst am Beispiel von β -Carotin untersucht werden. An Hand der Abbildung 11 läßt sich die Aussage machen, daß die Empfindlichkeit dieses Pigments besonders gegenüber Oxidantien wie NO_x sowie gegenüber dem Gasgemisch aus SO_2 und NO_x im Vergleich zu Chlorophyll größer war. Die Schwellenwerte für ein Ausbleichen von β -Carotin lagen allerdings etwas über denen, die für Chlorophyll a ermittelt wurden. Dies könnte wiederum auf den bereits diskutierten Effekt einer unzureichenden Sättigung des Gasraumes zurückzuführen sein, so daß die tatsächliche Empfindlichkeit der Photosynthesepigmente gegenüber Schadgasen besser bei höheren Gaskonzentrationen ermittelt werden sollte (vergl. Abb. 11). Eine Schutzfunktion des β -Carotins vor Schadstoffen ist insofern denkbar, als die Zerstörung von Chlorophyll zunächst dadurch verhindert wird, daß β -Carotin verstärkt abgebaut wird. Ähnliches ist auch bereits bei In-vitro-Versuchen belegt worden: Bei Zugabe von β -Carotin zu einer Chlorophylllösung wird diese vor Licht und Sauerstoffzerstörung geschützt, wohingegen ersteres Pigment starke Ausbleicherscheinungen zeigt (Mackinney und Chichester 1960).

Mit Ozon trat eine Reaktion überraschenderweise erst nach Zugabe von Linolensäure auf. Montalbini et al. (1978) studieren das Ausbleichen von Carotinoiden an Hand der Modellverbindung Crocin und stellen eine pH-abhängige Pigmentzerstörung fest. Diese ist in einem sauren Milieu stärker ausgeprägt als im alkalischen Bereich.

Denkbar wäre nun ein Mechanismus, bei dem die Hydroperoxidradikale, die bei der Reaktion von Ozon und Wasser auftreten (Hoigné und Bader 1975, Grimes et al. 1983) und zu einer Alkalisierung des Mediums führen (Heath 1979), zunächst durch Linolensäure abgefangen werden. Erst die dabei entstehenden Reaktionsprodukte, bei denen es sich größtenteils wiederum um Hydroperoxidradikale handelt (Hildebrand und Hymowitz 1982), reagieren im folgenden Schritt mit dem Pigment (Grosch und Laskawy 1979).

Im Vergleich hierzu trat eine Reaktion von β -Carotin mit NO_x auf Grund der schwachen Säurewirkung dieses Gases auch ohne Kofaktoren ein, wohingegen SO_2 aufgrund seiner reduzierenden Eigenschaften keine Pigmentausbleichung verursachte.

Für thylakoid-gebundenes β -Carotin treffen im großen und ganzen dieselben Aussagen zu (vergl. Abb. 12, Tab. 8). Gegenüber NO_x sowie gegenüber der Mischbegasung war ebenfalls eine ausgeprägte Empfindlichkeit festzustellen. Bei der Begasung mit SO_2 verhielt sich allerdings das protein-gebundene Pigment empfindlicher. Ein analoges Verhalten wurde auch bei Chlorophyll beobachtet, denn auch dieses Pigment war im Proteinverband gegenüber einem Angriff des obengenannten Gases anfälliger als im freien Zustand.

Als Erklärung für diesen Befund kann auch hier wieder die primäre Reaktion von SO_2 mit Lipidkomponenten der Membran angeführt werden. Erst in einer Sekundärreaktion erfolgt die Reaktion mit dem Pigment, die mit der beobachteten Pigmentausbleichung verbunden ist. Umgekehrt läßt sich auch die große Stabilität von freiem β -Carotin gegenüber SO_2 mit dieser Hypothese begründen.

Die Richtigkeit der geschilderten Theorie wurde jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt, sie ergäbe sich jedoch aus einem Experiment, bei dem reines β -Carotin unter Zusatz einer Fettsäure begast wird. Hier sollte dann eine Ausbleichung stattfinden.

Es sei jedoch darauf hingewiesen, daß die Ergebnisse, die

bei der Begasung von Ozon unter Fettsäurezusatz gewonnen wurden, für diese Erklärung sprechen, denn auch in diesem Fall wurde eine stärkere Pigmentausbleichung festgestellt als ohne Säurezugabe.

5.1.3.2 Verhalten und Funktion von β -Carotin in intakten Pflanzen

Die Verhältnisse in intakten Pflanzen werden von Lichtenthaler und Buschmann (1984) folgendermaßen dargestellt: Insbesondere β -Carotin, jedoch auch Chlorophyll a zeigen im Vergleich zu Xanthophyllen sowie zu Chlorophyll b eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber einer photooxidativen Ausbleichung. Dies konnte auch in diesen Versuchen bestätigt werden, da in den durchgeführten Lichtversuchen besonders in Anwesenheit von oxidierend wirkenden Verbindungen Chlorophyll a schneller abgebaut wurde als Chlorophyll b (vergl. Chl a/Chl b, Tab. 11, 12). Den schädigenden Einfluß von Oxidantien in Verbindung mit Licht beschreiben auch Schenk (1985) sowie Prinz et al. (1982). Diese Autoren konnten die phytotoxische Wirkung von PAN und Ozon unter Lichteinfluß nachweisen.

Über das Verhalten von β -Carotin in Pflanzen bei einer Begasung mit Ozon liegen keine eigenen Daten vor, jedoch berichten Senser et al. (1987) ausführlich über die Zerstörung von β -Carotin in 3-5 jährigen Fichten nach einer Ozonexposition. Im Vergleich zur Chlorophylldegradation erfolgt die β -Carotinabnahme schneller, so daß auch diese Forschergruppe eine besondere Reaktivität von β -Carotin gegenüber Oxidantien postulieren.

Die geschilderte Empfindlichkeitsabstufung der Pigmente konnte auch bei den Begasung mit NO_x sowie mit SO_2/NO_x bestätigt werden, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Die dabei gewonnenen Ergebnisse sprechen für einen Mechanismus, nach dem Chlorophyll vor einem Angriff durch

Schadgase dadurch geschützt ist, daß zunächst eine Zerstörung von β -Carotin eintritt.

Ferner muß in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen werden, daß der Weg der Pigmentkooxidation durch Abbauprodukte der Fettsäuren in vitro nachgewiesen wurde (Osswald und Elstner 1986), jedoch auch in vivo als Möglichkeit der beginnenden Einflußnahme des Schadstoffes auf die Pflanze in Erwägung gezogen wird (Pauls und Thompson 1981).

5.1.4 Verhalten der Xanthophylle unter Schadgaseinfluß

Zur Erforschung des Verhaltens von Xanthophyllen bei einer Schadgasexposition wurden zunächst die thylakoid-gebundenen Pigmente und sodann intakte Pflanzen eingesetzt.

Der Anteil der Einzelpigmente an der Gesamtcarotinoidsumme in Thylakoiden bzw. in Pflanzen deckt sich weitgehend mit den in der Literatur gemachten Angaben (Bahl 1977).

Für die unbegasten Organismen ergaben sich ca. 10% Neoxanthin und Violaxanthin, zwischen 30% und 40% β -Carotin sowie 40% - 50% Lutein. Der Prozentsatz der Summe aus Luteinepoxid und Antheraxanthin am Gesamtcarotinoidgehalt lag zwischen 0.8 und 1.4 (vergl. Tab. 10).

Bei einer Gasexposition konnte man sowohl in Thylakoiden wie in Pflanzen bei genügend hohen Gaskonzentrationen eine Pigmentabnahme beobachten. Hiervon ausgenommen war lediglich Antheraxanthin und Luteinepoxid. In Thylakoiden und in Pflanzen zeigten diese Pigmente Akkumulationserscheinungen und zwar in der Weise, daß deren prozentualer Anteil am Gesamtpigment durch eine Begasung auf den gleichen Wert anstieg. Dabei war die Zunahme in Pflanzen etwas größer als in Thylakoiden (vergl. Tab. 17). Dieser Befund wurde als Hinweis auf eine direkte chemische Reaktion zwischen Pigment und Schadgas betrachtet.

Für einen enzymatischen Ablauf sind mindestens intakte Chloroplasten erforderlich (Lüthke-Brinkhaus und Kleinig

1987), womit dieser Reaktionsweg in Thylakoiden ausgeschlossen ist. Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete ähnliche quantitative Verhalten der Xanthophylle in Thylakoiden und Pflanzen bei einer Begasung spricht dafür, daß auch in letzteren eher eine chemische als eine enzymatische Reaktion abläuft.

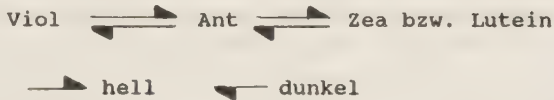
Die Empfindlichkeit von Carotinoiden gegenüber Schadstoffen war allerdings in Thylakoiden größer als in intakten Pflanzen. Dies entsprach den Beobachtungen, die auch bei der Untersuchung von Chlorophyll gemacht wurden und deutete ebenfalls darauf hin, daß zwischen Pigment und Schadgas direkte chemische Reaktionen ablaufen, die eine Ausbleichung zur Folge haben (vergl. Tab. 10, 16, 17).

Wie bereits geschildert, sind die Pigmente in Pflanzen besser geschützt als in Thylakoiden. Sie sind folglich einem äußeren Angriff durch Schadgase weniger ausgeliefert und zeigen deshalb geringere Pigmentabnahmen (vergl. Tab. 10, 17).

Zu bemerken war, daß die vereinzelt auftretenden Zunahmen der Xanthophylle im allgemeinen auf Kosten von β -Carotin erfolgte, so daß hier zunächst von einer oxidativen Umwandlung dieses Pigments in ein sauerstoffhaltiges Carotinoid ausgegangen werden muß. Vor allem in Thylakoiden war jedoch auch eine Abnahme der Carotinoidsumme zu verzeichnen (vergl. Tab. 17). Dieser Befund spricht dafür, daß neben der erwähnten Oxidationsreaktion auch noch ein Ausbleichen sowohl von β -Carotin wie von Xanthophyllen stattfand.

Die beobachteten Konzentrationsverschiebungen im Xanthophyllhaushalt manifestierten sich, wie bereits erwähnt, in einer Abnahme von Violaxanthin und in einer mehr oder weniger starken Akkumulation von Luteinepoxid bzw. Antheraxanthin sowie von Lutein. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen (Yamamoto et al. 1962, Hager 1967), die von den

Autoren mit dem sog. Violaxanthincyclus erklärt werden. Dieser läuft nach folgendem Schema ab:



Die lichtabhängige Reaktion wird durch äußere Streßbedingungen ausgelöst (Wise et al. 1987) und führt über Antheraxanthin als Zwischenprodukt zu einer Erhöhung des Luteingehaltes (Yamamoto und Takeguchi 1971). Bei einer Schadgasexposition könnte nun in Anlehnung an die bereits erwähnten Ergebnisse folgender Reaktionsmechanismus in Betracht kommen:

Unter dem Einfluß der untersuchten Gase kommt es besonders zu einer Ausbleichung von Chlorophyll a sowie von β -Carotin. Da diese Pigmente bevorzugt in den Reaktionszentren vorkommen (Brown 1987, Thornber et al. 1987), setzt die Schädigung wahrscheinlich an diesem Ort ein. Durch den Pigmentverlust wird ähnlich wie bei der Behandlung mit bestimmtem Herbiziden (Moreland und Novitzky 1987), möglicherweise der photosynthetische Elektronentransport gehemmt (Lichtenthaler und Buschmann 1984a), so daß die Lichtenergie nicht mehr in chemische Energie umgewandelt werden kann und somit photooxidative Schäden verursacht. Das Inkrafttreten des Xanthophyllzyklus verhindert dies, da die Lichtenergie statt in der Photosynthese nun in einer Deepoxidierungsreaktion verbraucht wird (Demmig et al. 1987).

5.1.5 Vergleich der Pigmentgehalte während der Seneszenz und nach NO_x -Begasung

Hauptmerkmale der Seneszenz sind neben einem RNA- und Proteinverlust der Abbau von Chlorophyll (Elkinawy 1984). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung stimmen mit diesem Literaturbefund überein, denn auch in dunkelgestelltem Hafer konnte eine rasche Chlorophyllabnahme gemessen werden.

Im Gegensatz hierzu nahm der Carotinoidgehalt nur langsam ab (vergl. Tab. 19). Dieser Befund, der sowohl für begaste wie für unbegaste Pflanzen gilt, wird durch die Arbeiten von Misra und Biswal (1983) bestätigt, denn auch diese Autoren finden, daß die Degradation von Chlorophyll während der Seneszenz schneller abläuft als die der Carotinoide. Während β -Carotin bis zum 4. Tag schnell abnimmt und danach nur noch geringfügige Änderungen eintreten, zeigt erstere einen linearen, stetigen Verlauf (Wittenbach 1977).

Aus der zeitlichen Entwicklung des Verhältnisses $\text{Chl a}/\text{Chl b}$ kann geschlossen werden, daß Chlorophyll a schneller abgebaut wird als Chlorophyll b (Kura-Hotta et al. 1987). Erst am 7. Tag zeichnete sich durch den Anstieg des Quotienten $\text{Chl a}/\text{Chl b}$ eine beginnende Degradation von Chlorophyll b ab, jedoch war in den mit NO_x begasten Proben selbst nach 7 Tagen Dunkelinkubation die Chlorophyll-b-Konzentration noch relativ hoch (vergl. Tab. 18, 19). Dies wird von Thornber et al. (1987) mit einer bevorzugten Degradation der Reaktionszentren in Verbindung gebracht.

Die Seneszenz der Carotinoide verlief derart, daß β -Carotin und Xanthophylle gleich schnell abnahmen. Dies kann aus der geringen Änderung des Quotienten Xant/Car (vergl. Tab. 18) geschlossen werden.

Auch Gut et al. (1987) stellen in Seneszenzversuchen mit verschiedenen Mutanten von *Festuca pratensis* fest, daß

während einer 7-tägigen Dunkelinkubation bei einer der Spezies eine gleich schnelle Abnahme von β -Carotin und der Xanthophyllsumme auftrat. Die begaste Probe zeigte im Vergleich zur Kontrolle eine etwas größere Änderung dieses Quotienten, was auf den Schadgaseinfluß zurückzuführen ist. Die Carotinoidsumme war nach einer 7-tägigen Dunkelinkubation sowohl in begasten wie in unbegasten Pflanzen die gleiche, woran auch die beobachtete schnellere Abnahme von Neoxanthin in den gasexponierten Proben nichts änderte. Anzumerken ist jedoch, daß dieses Pigment auch in den Kontrollpflanzen während der Seneszenz eine beträchtliche Abnahme zeigte. Chichester und Nakayama (1965) schildern ebenfalls eine im Vergleich zu den restlichen Xanthophyllen besonders große Reduzierung von Neoxanthin in seneszenten Herbstblättern.

Der Anteil von Lutein am Gesamtpigment blieb relativ konstant, d.h. dieses Pigment nahm im Verlauf der 7-tägigen Seneszenz am wenigsten ab, was auch von Eichenberger und Grob (1962) bereits beobachtet wurde.

Die Pigmentkonzentrationen in begasten und unbegasten Pflanzen wiesen nach der 7-tägigen Dunkelinkubation keine signifikanten Unterschiede mehr auf. Man muß daher davon ausgehen, daß bei einem erhöhten Ausgangsgehalt die Pigmentabnahme in den gasexponierten Proben zwar schneller erfolgte, daß dies aber insgesamt gesehen den Verlauf der Seneszenz nicht beeinträchtigte. In diesem Fall hätte eine Dunkelinkubation besonders im späten Stadium deutlichere Differenzen im Pigmentgehalt ergeben müssen.

Ein Vergleich der Pigmentgehalte von Pflanzen, die im Licht begast und nicht dunkelgestellt wurden, mit den Konzentrationen der Blattfarbstoffe in seneszenten Proben zeigt, daß sich Neoxanthin und Violaxanthin in den schadgasexponierten Proben umgekehrt verhielten wie in den dunkelgestellten Pflanzen. Wie bereits erwähnt, wurde durch die Begasung der Violaxanthinzyklus stimuliert, was zu einer

Abnahme dieses Pigments führte, während sich die Neoxanthinkonzentration unter denselben Bedingungen wenig änderte. Im Verlauf der Seneszenz verringerte sich der Quotient Neoxanthin:Violaxanthin. Auch der Luteingehalt zeigte eine abnehmende Tendenz, die jedoch schwach ausgeprägt war.

Diese Beobachtungen sprechen nicht für das Auftreten des Violaxanthinzyklus während der Seneszenz. Wie bei der Begasung zeigte Chlorophyll a auch bei der Seneszenz die größere Empfindlichkeit, jedoch kam es bei letzterem Prozeß zu drastischen Pigmentabnahmen, während bei einer Gasexposition je nach Dosis sogar Zunahmen gemessen wurden. Ein Vergleich des Verhaltens von β -Carotin und Chlorophyll während der beiden Prozesse führt ebenfalls zu unterschiedlichen Ergebnissen: Bei der Begasung zeigte β -Carotin im Vergleich zu Chlorophyll die größere Empfindlichkeit, während letzteres Pigment im Verlauf des Seneszenzprozesses weitaus rascher abgebaut wurde als β -Carotin.

Hieraus folgt, daß der Pigmentabbau während der dunkelinduzierten Seneszenz anderen Mechanismen unterliegt, als während einer Begasung.

Die Pigmentdegradation im Licht wird sowohl in Pflanzen mit bzw. ohne Schadgasexposition (Senser et al. 1987, Chang et al. 1974 bzw. Thimann 1980) als auch in Algen unter Starklichtbedingungen (Sironval und Kandler 1958) beobachtet und in allen Fällen auf photooxidative Prozesse zurückgeführt. Mit diesem Mechanismus muß neben der direkten Reaktion von Schadstoff und Pigment bei der Begasung im Licht gerechnet werden, denn hier waren im Vergleich zu den Parallelversuchen unter Lichtausschluß immer größere Pigmentabnahmen zu verzeichnen.

Für die Degradation der Blattfarbstoffe während der dunkelinduzierten Seneszenz werden enzymatische Reaktionen (Biswal 1984, Choe und Thimann 1975) vorgeschlagen, photooxidative Prozesse kommen dagegen nicht in Frage.

Lütz (pers. Mitteilung) wies bei Langzeitbegasungen von

Fichten mit Ozon ebenfalls einen erhöhten Antheraxanthin- und Luteingehalt nach. Beachtenswert ist jedoch, daß das Ergebnis erhalten wurde, obwohl hier Gaskonzentrationen zum Einsatz kamen, die in etwa den umweltrelevanten Immissionswerten entsprachen und die demnach weit unter denen lagen, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Auch die von v. d. Ropp (1985) durchgeführten Pigmentanalysen von Nadeln erkrankter Fichten aus dem Bayerischen Wald ergaben einen erhöhten Antheraxanthinanteil.

Diese Tatsachen sprechen dafür, daß derartige quantitative Verschiebungen im Xanthophyllhaushalt, und hier insbesondere eine Anhäufung von Antheraxanthin möglicherweise als Kriterium zur Früherkennung von Immissionsschäden in Pflanzen einsetzbar sind.

5.1.6 Vergleich der Pigmentgehalte in etioliertem Hafer

Die Inkubation mit 2, 2'-Bispyridin führte unter Lichtausschluß zu einer Erhöhung der Protochlorophyllidkonzentration. Analoge Beobachtungen konnten bei der Begasung mit Stickoxiden gemacht werden. Die verwendete Gaskonzentration (200 ppm) war jedoch relativ hoch, und ein Schwellenwert für das Auftreten dieses Phänomens wurde nicht festgelegt. Es ist somit noch unklar, ob umweltrelevante Immissionswerte zu demselben Ergebnis führen. Die Akkumulation dieser Chlorophyllvorstufe bei Gabe von aromatischen Stickstoffbasen ist seit längerer Zeit bekannt und bereits eingehend beschrieben worden (Duggan und Gassmann 1974, Gassmann und Duggan 1974, Granik 1963, 1961). Bisher unbekannt war, daß offenbar die Einwirkung von Stickoxiden ebenfalls zu einer Anhäufung von Protochlorid führt.

Nach einer 4-stündigen Belichtung traten im inkubierten Material nach ca. 1.5 h sichtbare Schäden auf, die sich in

einer allmählichen Einschnürung des Hypokotyls manifestierten. Die führte nach 4-8 h zu einem Umknicken und Welken der Pflanzen.

Anders lagen die Verhältnisse in begastem Material. Hier wurde zwar ein Eintrocknen der Blattspitzen beobachtet, der weitere Ergrünungsprozeß verlief jedoch ansonsten normal und es kam nicht zum Absterben der Pflanzen. Die Pigmentanalysen bestätigten diesen Eindruck, denn der Chlorophyllgehalt entsprach dem der Kontrolle.

72 h alter bispyridin-behandelter Hafer zeigte jedoch einen Pigmentverlust von 20%, und bei einer Reduzierung des Alters auf 50 h konnten sogar Ausbleichraten von 80% gemessen werden.

Auf Grund der umfangreichen Voruntersuchungen von Hanfstingl (1987) war nach einer 17-stündigen Inkubation von 7 Tage altem etioliertem Hafer mit 2, 2'-Bispyridin und anschließender Belichtung ein Chlorophyllverlust von ca. 50% zu erwarten. Dieser wird im allgemeinen mit einer Photosensibilisierung in Verbindung gebracht, die durch die Porphyrinakkumulation hervorgerufen wird (Hopf und Witten 1978, Latham und Bloomer 1983).

Die altersabhängige Empfindlichkeit von Hafer gegenüber der hier verwendeten Chemikalie wurde bisher jedoch weniger beachtet. Rebeiz et al. (1984) berichten zwar von einer Korrelation zwischen Alter und Herbizidschäden, die aber mit einer spezieabhängigen Selektivität verbunden ist. Insbesondere den dikotylen Pflanzen wurde eine hohe Sensibilität gegenüber 2, 2'-Bispyridin zugesprochen, während sich Monokotyle relativ indifferent verhalten sollen. Auf Grund der vorliegenden Befunde kann letzteres nicht bestätigt werden.

Die nach 4 Stunden bestimmten Photoumwandlungsraten ließen sowohl für die bispyridin-behandelten wie für die begasten Pflanzen wenig Unterschied zur Kontrolle erkennen. Dieser Befund deutet darauf hin, daß die erste lichtabhängige Reaktion (Boardman 1966) der Chlorophyllbiosynthese, nämlich

die Konversion von Protochlid zu Chlid sowohl nach der Chemikalieninkubation wie nach der Gasexposition ohne Störung abläuft. Eine Hemmung der Enzymaktivität der Protochlid-Oxidoreduktase, die diesen Reaktionsschritt katalysiert (Castelfranco und Beale 1981, Griffith 1974) durch 2, 2'-Bispyridin oder durch eine Gasexposition ist somit auszuschließen.

Die Aktivierung dieses Enzyms erfolgt durch einen Lichtblitz (Griffith 1974, 1978). Daher erwartet man bei einer Blitzbelichtung mit anschließender sofortiger Pigmentextraktion, daß die Photoumwandlungsraten der Kontrollen sowie die der bispyridin-inkubierten und gasexponierten Pflanzen wenig Unterschied zeigen. Dies konnte auch in den durchgeführten Blitzbelichtungsversuchen (vergl. Tab. 21) verifiziert werden.

In der folgenden Dunkelreaktion der Chlorophyllbiosynthese kommt es zur Veresterung von Chlid mit Geranyl-Geraniol. Sodann folgt die mehrstufige Hydrierung des Alkohols zum Phytol (Schoch et al. 1977). Betrachtet man nun den Prozentsatz an verestertem Chlorophyll (Tab. 22), so stellt man bei 50 h altem, 2, 2'-bispyridin-behandeltem Hafer im Vergleich zur Kontrolle einen deutlich geringeren Umsatz fest. Bei 72 h altem, 2, 2'-bispyridin-behandeltem, sowie gasexponiertem Material weichen die Daten hingegen nur geringfügig von den Kontrollwerten ab.

Diese beobachtete altersabhängige Empfindlichkeit spricht dafür, daß das für die Veresterung zuständige Enzym Chlorophyllsynthetase (Rüdiger et al. 1977, 1980) in einem frühen Stadium seiner Entstehung durch die Chemikalienbehandlung beeinträchtigt wird. Denkbar wäre, daß bereits eine Beeinflussung der Transskription vorliegt, die die Synthese dieses Enzyms veranlaßt. Insbesondere m-RNA ist schon zu einem frühen Entwicklungsstadium in der Pflanze vorhanden (Marciniak et al. 1987), jedoch ist ihre Konzentration nicht konstant, sondern weist ein

altersabhängiges Maximum auf, das mit der Konzentration des entsprechenden Proteins korreliert (Schmidt et al. 1987). Wird durch Gabe von 2, 2'-Bispyridin die Konzentration der m-RNA verändert, so wären demnach auch Auswirkungen auf die entsprechende Enzymkonzentration bzw. -aktivität zu erwarten (Spiller et al. 1987). Diese Hypothese bedarf jedoch noch einer Bestätigung durch weiterführende Versuche.

Die Gasdosen, unter denen man die Veresterungsreaktion durchführte, lagen vergleichsweise niedrig, jedoch konnte auch durch den Einsatz von etioliertem Material bei diesen Immissionswerten kein Pigmentverlust festgestellt werden. Lediglich bei der Mischbegasung war ein reduzierter Gehalt an Tetrapyrrolen zu verzeichnen. Die Veresterungsrate zeigte auch hier im Vergleich zur Kontrolle keine Beeinträchtigung. Die Biosynthese verlief unter diesen Umständen bis zum Chlorophyll, welches im Gegensatz zum unveresterten Chlid protein-gebunden ist (Markwell et al. 1979).

Nach den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen, sollte Chlid daher leichter degradieren als Chlorophyll. Dieser Mechanismus trifft nach dem oben Gesagten für begaste Pflanzen nicht zu, er wäre jedoch für die Pigmentaubleichung denkbar, die durch die Chemikalieneinwirkung verursacht wurde. Auf Grund der gehemmten Synthetaseaktivität kommt es hier zur Chlidgebildung, während nur wenig Chlorophyll entsteht. Das unveresterte Pigment unterliegt jedoch einer verstärkten Photooxidation, zumal durch die Porphyrinakkumulation eine erhöhte Photosensibilisierung vorliegt.

Auf die Carotinoide hatten 2, 2'-Bispyridin und Schadgase folgende Wirkungen:

Im Dunkeln trat zunächst eine oxidative Pigmentzerstörung durch NO_x ein. Bei der anschließenden Belichtung fand offenbar eine Resynthese statt, die so viel Carotinoide nachlieferte, daß der Pigmentgehalt der Kontrollpflanzen wieder erreicht wurde.

Aus diesen Beobachtungen kann geschlossen werden, daß durch die NO_x -Begasung weder die Funktion noch die Synthese der Enzyme beeinträchtigt wurde, die an der Carotinoidbiosynthese beteiligt sind. Die Dunkelbegasung von etioliertem Hafer mit relativ niedrigen Gaskonzentrationen führte auch bei der anschließenden Blitzbelichtung nicht zu Änderungen im Carotinoidgehalt. Nach Britton (1976) soll die Carotinoidsynthese auch durch eine kurzzeitige Belichtung ausgelöst werden, da hierbei bereits ein lichtabhängiger, jedoch nicht näher definierter Induktionsfaktor gebildet wird.

Das Ergebnis dieses Experiments läßt darauf schließen, daß durch eine Begasung die Synthese dieses Faktors ebenso wenig beeinflusst wurde wie die der anderen Enzyme. Eine hohe Stickoxidkonzentration hatte ebenfalls keinen Einfluß auf die lichtabhängige Pigmentbildung (vergl. Tab. 22). Eine Erklärung für die im Dunkeln beobachtete Zerstörung von β -Carotin wäre eine direkte chemische Reaktion zwischen Gas und Pigment.

Mit Ausnahme der Porphyrinakkumulation waren keine Gemeinsamkeiten in der Wirkung einer Begasung und von 2, 2'-Bispyridin auf die Chlorophyllbiosynthese festzustellen. Die beobachtete Anhäufung von Chlorophyllvorstufen wird unter der Einwirkung von 2, 2'-Bispyridin mit einer verstärkten Produktion von Aminolävulinsäure erklärt (Duggan und Gassmann 1974).

Im Falle einer Stickoxidexposition könnte man zunächst vermuten, daß durch das Überangebot von Stickstoff die Synthese von Tetrapyrrolpigmenten stimuliert wird. Gegen diese Theorie spricht jedoch, daß mit NO_x insbesondere in grünem Hafer gleichzeitig auch ein erhöhter Carotinoidgehalt festzustellen war.

Srivastava und Omrod (1984) beobachteten bei einer NO_x -Begasung von grünen Bohnenpflanzen ebenfalls einen allgemein erhöhten Pigmentgehalt und führen dies auf eine verstärkte Bildung von Chloroplasten zurück, wohingegen hier eine Stimulation der Tetrapyrrolsynthese ausdrücklich

ausgeschlossen wird. Als Begründung geben die Autoren die gleichzeitig erhöhte Carotinoidkonzentration an.

Yoneyama und Sasakava (1979) berichten ferner von einem verstärkten Einbau des NO_2 -Stickstoffes in Aminosäuren, nicht jedoch in Tetrapyrrolpigmente.

Eine Gasexposition hatte demnach keine signifikanten Auswirkungen auf die lichtabhängige Biosynthese von Photosynthesepigmenten.

5.2 Qualitative Pigmentanalysen

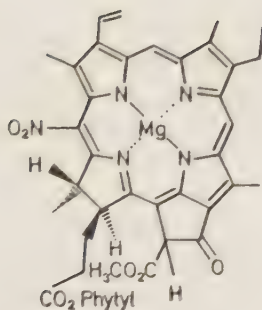
5.2.1 Begasung von reinem Chlorophyll a

5.2.1.1 Mit NO_x

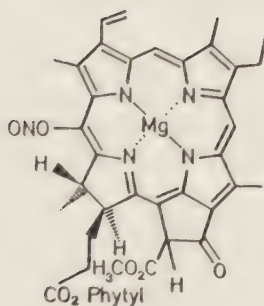
Bei der Begasung von Chlorophyll a mit NO_x entstanden 3 Hauptprodukte X_1 - X_3 . Die im Vergleich zum Edukt früheren Elutionszeiten sowie die höheren R_f -Werte (vergl. Tab. 27, Abb. 10) sprechen für eine relativ polare Struktur. Diese könnte in folgenden Reaktionen entstanden sein:

1. Elektrophile Substitution

Das elektronenreiche aromatische Tetrapyrrolsystem wird leicht von elektrophilen Substituenten angegriffen. Die Reaktion erfolgt bevorzugt in der δ -Position gegenüber dem reduzierten Ringsystem (Hynninen und Lötjönen 1981) und könnte zu den monosubstituierten Nitrochlorophyllen I und II führen.



I



II

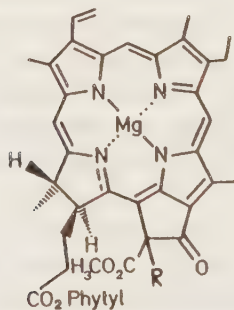
Für diese Möglichkeit spricht die Form der Peaks des Absorptionsspektrums, die im Vergleich zum Edukt eine Verbreiterung aufweist, verbunden mit einer verhältnismäßig gering ausgeprägten Feinstruktur. Derartige Beobachtungen konnten bereits bei einer Störung bzw. Unterbrechung der aromatischen Konjugation gemacht werden (Scheer, 1978) und sind mit dem stark elektronenziehenden Effekt des Nitrosubstituenten erklärbar (Christen, 1977).

Ein weiteres Argument für die Strukturen I und II ist das Fehlen der Fluoreszenz. Ähnliche Spezies werden von Bonnett und Stephenson (1965) beschrieben: unter relativ milden Reaktionsbedingungen (2 h, Raumtemperatur) konnten Porphyrine mit Nitroxytetrafluoroborat in entsprechende nicht fluoreszierende Mononitroverbindungen überführt werden.

2. Oxidationsreaktionen

Unter dem Einfluß oxidierender Reagenzien können Chlorophylle auch Degradationsreaktionen eingehen (Fuhrhop 1978), die zu einem Produktgemisch führen (Fischer und Hilger 1931, Fischer und Fröwis 1925).

Ein derartiger Reaktionsablauf ist mit einer Allomerisierungsreaktion vergleichbar, die in der Regel in Methanol unter Einfluß von Luftsauerstoff durchgeführt wird (Holt 1958) und bei der ebenfalls mehrere Produkte auftreten. So weist Schmidt (1985) u. a. 13^2 -Hydroxy- bzw. Methoxychlorophyll (IIIa, $R = OH$, bzw. IIIb, $R = OCH_3$) als Hauptkomponenten im Reaktionsgemisch nach.

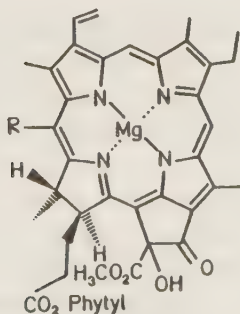


$R = -OH$: IIIa, $R = -OCH_3$: IIIb

Bei der Begasung von Chlorophyll a mit Stickoxiden sind ebenfalls Reaktionen denkbar, die zu einem Substituentenaustausch am 13^2 -C-Atom führen. Als Indiz hierfür kann die Vergrößerung des Verhältnisses S:L (Soretbande:langwelliger Absorptionsbande) genannt werden, die nach der Begasung von Chlorophyll mit Stickoxiden zu beobachten war.

Auch die Pheophytinisierung des begasten Pigments ließ Verbindungen mit einem Quotienten S:L entstehen, der mit 2.33 deutlich über dem Wert lag, der für Pheophytin gemessen wurde ($S:L = 2.00$, vergl. Tab. 27). Theoretisch mögliche Reaktionsprodukte wären beispielsweise die nitrierten Hydroxyverbindungen IVa, IVb.

Die Struktur IV zeichnet sich durch eine relativ hohe Polarität aus, die dem Laufverhalten der Produkte X mit dem Dünnschichtsystem 3 (Abb. 14) nicht widersprechen würde.



IV

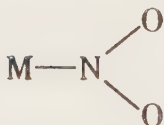
$R = -ONO$: IVa, $R = -NO_2$: IVb

Der positive Verlauf des Phasentests spricht jedoch eher für die Strukturen I, II. In dieser Reaktion, die bereits 1896 von Molisch entdeckt wurde, findet mit KOH eine Abstraktion des Protons am 13^2 -C-Atom statt. Dies ermöglicht eine Keto-Enol-Tautomerisierung.

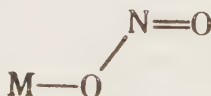
In der Verbindung IV wird jedoch mit KOH vorzugsweise das basischere Hydroxy-Proton abgespalten. In diesem Fall entsteht das entsprechende Kaliumsalz, welches durch seinen elektronenschiebenden Charakter die Abstraktion des 13^2 -Protons erschwert. Mit Hilfe des Phasentests kann jedoch keine Aussage über die Art der Substituenten am 13^2 -C-Atom gemacht werden, sondern lediglich die Unversehrtheit des β -Ketoesters bewiesen werden.

3. Komplexierung des Magnesiumatoms

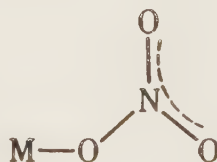
Als dritte Reaktionsmöglichkeit muß noch eine Komplexierung des Zentralatoms M (für Chlorophyll: M = Mg) durch das in Lösung entstandene Nitrat- bzw. Nitrition in Betracht gezogen werden. Dies kann in folgender Weise geschehen:



Va



Vb



Vc

(Cotton und Wilkinson 1982)

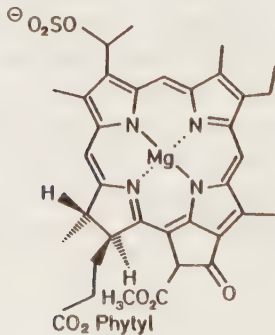
Diese 5-fach-Koordinierung des Magnesiumatoms wird in der Regel mit polaren Lösungsmittelmolekülen beobachtet (Katz et al. 1978), wäre theoretisch jedoch auch mit dem ebenfalls polaren Nitrat- bzw. Nitrition denkbar. Das Nitration ist allerdings als Komplexligand leicht austauschbar (Basolo und Pearson 1973) und hätte somit beispielsweise bei der Pheophytinisierung von X wieder abgespalten werden müssen. Für diese Vermutung spricht das Auftreten von unverändertem Pheophytin a in einer Probe, die quantitativ zu den Produkten X umgesetzt und anschließend pheophytinisiert wird.

Auffallend war das Laufverhalten des nichtfluoreszierenden Pheophytinderivats. Da die Entstehung polarer Produkte X postuliert wird, sollte diese Eigenschaft auch nach der Entfernung des Magnesiumatoms noch vorhanden sein. Gegen diese Behauptung spricht jedoch der niedrigere R_F -Wert mit System 3 bzw. der höhere Wert mit System 4 (vergl. Tab. 27). Auch das Elutionsdiagramm der pheophytinisierten Probe zeigt bei 21 min. ein nichtfluoreszierendes Produkt, während Pheophytin a bereits bei 20 min. eluiert wird. Für diesen Befund kann bisher noch keine Erklärung gefunden werden, es sei jedoch bemerkt, daß in der Literatur bereits ähnliche Phänomene beschrieben wurden. So berichtet Schmidt (1985) über das anormale Laufverhalten eines Dihydroxypheophorbids, welches im Vergleich zur Monohydroxyverbindung mit System 4 einen höheren R_F -Wert aufwies. Auch das 13²-Hydroxy-20-chlormethylpheophorbid soll ein ähnlich ungewöhnliches Laufverhalten gezeigt haben (Scheer et al. 1986).

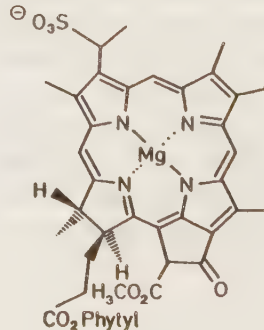
5.2.1.2 Begasung von Chlorophyll a und Thylakoiden mit SO_2 sowie mit SO_2/NO_x

Das Absorptionsspektrum von SO_2 -behandeltem Chlorophyll a zeigte im Gegensatz zum NO_x -exponierten Material eine gut ausgeprägte Feinstruktur. Bei der Mischbegasung überwog bei höheren Gaskonzentrationen der Einfluß von NO_x . Auf Grund der im vorhergehenden Abschnitt gemachten Überlegungen, nach denen der Verlust der spektralen Feinstruktur mit einer Störung der aromatischen Konjugation in Verbindung gebracht wird, kann nun postuliert werden, daß bei der Einwirkung von SO_2 offenbar keine Beeinflussung des Ringsystems auftritt. Der Angriffspunkt von SO_2 liegt wahrscheinlich eher in der Molekülperipherie (vergl. Abb. 13), wobei die Produkte Z entstehen.

Auf Grund der Untersuchungen von Haslberger (1986) kann als mögliche Struktur in Analogie zur Bisulfitaddition (March 1983) eine Addition von Sulfit an die Vinylgruppe (Struktur VI) vorgeschlagen werden.



VIa



VIb

Verbindungen dieses Typs werden auch von Isenring et al. (1975) u.a. bei der Reaktion von Chlorophyll a mit Magnesiummercaptiden beschrieben. Hier kommt es zu einer Addition von Thiophenolen an die Vinylgruppe.

Auch die Zunahme des Verhältnisses S:L sowie die kurzwellige Verschiebung des Maximums widersprechen diesen Überlegungen nicht (Holt 1966).

Mittels chromatographischer Methoden wurde bewiesen, daß bei der Begasung von Chlorophyll a und Thylakoiden mit SO_2 mindesten 3 Produkte entstehen, denen auf Grund ihrer R_f -Werte (vergl. Abb. 14) eine polarere Struktur als dem Edukt zugeschrieben werden muß. Die oben erwähnte Desvinylstruktur als Grundtypus der verschiedenen Spezies Z wäre mit dem im Vergleich zu Chlorophyll a polareren Charakter vereinbar. Durch welche zusätzlichen Modifikationsreaktionen es zum Auftreten von 3 - 4 Verbindungen kam, wurde bisher noch nicht explizit untersucht. Es ist nicht auszuschließen, daß ähnlich einer Allomerisierung beim Stehen an Luft verschiedene Oxidationsprodukte entstanden, deren R_f -Werte ebenfalls zwangsläufig polarer wären als der des Produkts.

Die geschilderten Beobachtungen stehen im Einklang mit den von Smith (1975) beschriebenen Eigenschaften der Porphyrine, wonach das aromatische Ringsystem gegenüber Schwefelsäure stabil ist, jedoch leicht von Oxidantien wie Permanganat, Chromsäure oder Perchlorsäure angegriffen wird.

Die Begasung von Chl a (Chl b) mit Stickoxiden führte zu den Produkten X (Y). Sowohl thylakoid-gebundenes wie freies Pigment wiesen für das Auftreten der Produkte X deutlich niedrigere Schwellenwerte auf als für das Auftreten von Z. Die Schwellendosis für Thylakoide lag für beide Verbindungen über dem Wert, der für das freie Pigment bestimmt wurde.

Die quantitativen Pigmentanalysen lieferten mit Ausnahme der SO_2 -Begasung dasselbe Ergebnis, was als Hinweis für die Schutzwirkung des Proteins gegenüber einem direkten chemischen Angriff von Schadgasen auf Chlorophyll angesehen

werden kann. Bei einer SO_2 -Exposition reagierte thylakoid-gebundenes Chlorophyll im Vergleich zum freien Pigment in einer Ausbleichreaktion schneller.

Bei der Entstehung der Produkte Z herrschten jedoch genau umgekehrte Verhältnisse. In diesem Fall entstanden die Verbindungen Z analog der Chlorophyllderivate X mit nicht-protein-gebundenem Chlorophyll bei geringeren Schadstoffdosen als beim Einsatz von Thylakoiden.

Dieses Verhalten steht nicht im Widerspruch zu den Ausführungen, mit der die quantitative Pigmentabnahme bei einer SO_2 -Exposition in protein-gebundenem sowie im freien Pigment erklärt wird. Hiernach erfolgt primär ein Angriff auf die Membran- bzw. Lipidkomponenten. Die dabei entstandenen Produkte verursachen in erster Linie ein Ausbleichen der Photosynthesepigmente. Erst bei höheren Schadstoffkonzentrationen erfolgt nicht nur eine Abreaktion des Schadgases an der Membran, sondern auch eine Umsetzung mit Chlorophyll zu den Verbindungen Z.

5.2.2 Begasung von reinem β -Carotin mit SO_2 , NO_x und SO_2/NO_x

Die Begasung von β -Carotin lieferte in keinem Fall neuartige schadstoffspezifische Derivate. Auch eine Oxidation zu Xanthophyllen konnte weder dünnschichtchromatographisch noch mittels HPLC nachgewiesen werden. Auf Grund der beobachteten Pigmentausbleichung unter dem Einfluß von NO_2 sowie von SO_2/NO_x muß die Entstehung farbloser Verbindungen postuliert werden. Insbesondere Xanthoxin bzw. xanthoxinanalogue Verbindungen, deren Entstehung aus β -Carotin von Firn und Friend (1972) beschrieben werden, kommen hier in Betracht. Allerdings findet in der zitierten Arbeit eine enzymatische Oxidation des Pigments durch Lipoxygenase statt.

Ziel der vorliegenden Arbeit war das Auffinden farbiger Derivate der Photosynthesepigmente, die möglicherweise unter dem Einfluß der obengenannten Schadstoffe entstehen. Aus

diesem Grund wurde das Auftreten von farblosen Verbindungen nicht weiter untersucht.

5.2.3 Begasung von Pflanzen mit SO_2 , NO_x und SO_2/NO_x

Beim Einsatz von Pflanzen an Stelle von reinem Pigment bzw. Thylakoiden waren in qualitativer Hinsicht dieselben Tendenzen festzustellen, die bereits bei den quantitativen Pigmentanalysen beobachtet wurden.

In beiden Fällen benötigte man bei Pflanzen selbst zur Erzeugung minimaler Mengen von Chlorophyllabbauprodukten im Vergleich zum isolierten Pigment sehr viel größere Schadstoffkonzentrationen. So entstanden beispielsweise bei einer NO_x -Exposition mit 700 ppm nur ca. 8% Abbauprodukte bezogen auf den Gesamtchlorophyllgehalt (vergl. Tab. 26), und auch unter Lichteinfluß führte das analoge Experiment nur zu einem geringfügig höheren Umsatz (vergl. Tab. 29).

Als Erklärung hierfür können wiederum die im Vergleich zum Reinpigment bzw. zu Thylakoiden vermehrt vorhandenen Penetrationsbarrieren wie Membranen oder auch der Öffnungsgrad der Stomata angeführt werden. Auch das Auftreten von anderen Edukten, beispielsweise von Fettsäuren, die möglicherweise früher als die Photosynthesepigmente mit den eintretenden Gasen reagieren (Pryor und Lightsey, 1981), muß bei der Verwendung von Pflanzen für die Begasungsexperimente in Erwägung gezogen werden.

Die chromatographischen Analysen lassen darauf schließen, daß bei der Begasung von Pflanzen dieselben Produkte entstanden wie bei der Verwendung von isoliertem Pigment bzw. von Thylakoiden. Dieser Befund spricht für eine direkte chemische Reaktion zwischen Pigment und Gas, allerdings können in Pflanzen zusätzliche enzymatische Reaktionen nicht ausgeschlossen werden (Kardish et al. 1987).

Bei der Begasung mit Stickoxiden tauchten zunächst die

nichtfluoreszierenden schadstoffspezifischen Abbauprodukte X bzw. Y auf. Derartige Verbindungen wurden bereits 1963 von Kändler und Ullrich in NO_x -begasten Pflanzen gefunden. Neben den Spezies X und Y entstanden noch eine Reihe weiterer fluoreszierender Substanzen, insbesondere Hydroxychlorophyll a. Dieses Chlorophyllderivat, das dünnschichtchromatographisch identifiziert wurde, ist jedoch als Aufarbeitungsartefakt zu betrachten, da es auch in den Kontrollen auftrat. Die Entstehung von Chlorophylldegradationsprodukten bei der Einwirkung von SO_2 auf Pflanzen ist seit langem bekannt (Röben und Dörries 1932, Müller 1957). Eine genaue Strukturaufklärung dieser Verbindungen fand jedoch bisher nicht statt.

Für eine Produktentstehung auf chemischem Weg spricht die Tatsache, daß die schadstoffspezifischen Verbindungen unabhängig von den eingesetzten Pflanzenarten auftraten. Enzymatische Reaktionen weisen häufig artabhängige Besonderheiten auf (Alscher et al. 1987). Sämtliche getesteten Pflanzen erwiesen sich allerdings gegenüber einer Schadstoffexposition als relativ resistent, denn bei keiner der eingesetzten Arten waren bei umweltrelevanten Gaskonzentrationen, abgesehen von Artefakten, Abbaupigmente zu detektieren. Zunächst vermutete man, daß Moose aufgrund der fehlenden Stomata, an deren Stelle Poren mit einem konstanten Öffnungsgrad treten (Raven et al. 1985), auf Schadgase empfindlicher reagieren als die bisher getesteten Pflanzen. Es gelang auch, die Gaskonzentrationen um ca. die Hälfte zu reduzieren, bei einer weiteren Verringerung der Dosis waren jedoch keine Unterschiede zu den Kontrollpflanzen zu erkennen.

5.3 Freilanduntersuchungen

Die qualitative Betrachtung der Pigmente ergab keine Hinweise auf eine indirekte Einflußnahme von Luftschadstoffen auf die Photosynthesepigmente, daher wurden bei den Freilanduntersuchungen schwerpunktmäßig quantitative Pigmentanalysen durchgeführt.

Bezüglich der Chlorophyllkonzentration ergaben sich für die beiden Standorte Hirschgarten und Effnerplatz keine signifikanten Unterschiede. Im Herbst waren zwar Differenzen von bis zu 50% zu verzeichnen (vergl. Abb. 21), allerdings lagen auch die relativen Standardabweichungen (vergl. Tab.4, 5) in diesem Bereich, so daß jene nicht als signifikant angesehen wurden.

Analoges galt für das Verhältnis Chlorophyll a/Chlorophyll b. Auch hier müssen insbesondere die im Herbst gewonnenen Ergebnisse, die auf einen rascheren Abbau von Chlorophyll b in der schadstoffbelasteten Region schließen ließen, mit experimentellen Schwankungen erklärt werden. Zwar wird ein rascherer Chlorophyll-b-Abbau auch von v.d. Ropp (1985) bei erkrankten Fichten beobachtet, andererseits ermitteln Lichtenthaler und Buschmann (1984a) in vergilbten Fichtennadeln einen kleineren Quotienten Chlorophyll a/Chlorophyll b und schließen daraus auf einen verstärkten Abbau der überwiegend chlorophyll-a-haltigen Reaktionszentren, insbesondere durch photooxidative Prozesse. Auch für krautige Pflanzen wurde unter Schadstoffeinfluß ein geringeres Verhältnis Chlorophyll a/Chlorophyll b beschrieben. So stellt Rudolf (1979) einen verstärkten Abbau von Chlorophyll a in Petunien und Tabakpflanzen fest, die in unmittelbarer Straßennähe wachsen. Bereits in 30 - 60 m Entfernung von der Fahrbahn ist dieses Phänomen allerdings nicht mehr nachzuweisen.

Als Schlußfolgerung kann somit festgehalten werden, daß am Effnerplatz eine photooxidative Pigmentschädigung ausge-

geschlossen ist. Diese wird erst in größeren Höhen bei einer Zunahme der UV-Strahlung erwartet (Frank und Frank 1985, Rehfuess 1987a), die unter den Luftschadstoffen Radikalreaktionen auslöst (Wellburn et al. 1980). Die dabei entstehenden Verbindungen werden für den verstärkten Pigmentabbau verantwortlich gemacht (Elstner 1983a).

Das Chlorophyll a/Chlorophyll-b-Verhältnis kann größeren individuellen Schwankungen unterliegen (Wild und Bode 1986), bedingt durch die Fähigkeit der Pflanzen, sich durch Änderungen im Pigmenthaushalt den bestehenden Lichtverhältnissen anzupassen (Wild 1979, Rühle und Wild 1985). Es ist nicht auszuschließen, daß die standortlich bedingten Differenzen in den Pigmentgehalten, die in diesen Versuchen gemessen wurden, nicht nur experimentell bedingt sind, sondern daß auch eine derartige Adaption an die Lichtverhältnisse eine Rolle spielt.

Die ermittelten jahreszeitlichen Schwankungen in der Chlorophyllkonzentration ergaben einen charakteristischen Kurvenverlauf. Auch für andere Pflanzenarten ist eine derartige Zu- und Abnahme im Herbst bereits mehrfach beschrieben worden (Senser und Beck 1979, Horntvedt 1983, Lewandowska und Jarvis 1977).

Die quantitativen Analysen der einzelnen Carotinoide sowie des Gesamt-xanthophyllgehaltes zeigten insbesondere während der Sommermonate keine standortlich bedingten Unterschiede, die auf eine beginnende Schädigung hindeuteten.

Auf Grund der bisherigen Ergebnisse sowie der vorliegenden Literaturdaten hätte man nämlich in diesem Fall vor allem für β -Carotin einen geringeren Pigmentgehalt feststellen sollen (Kandler pers. Mitteilung, Arndt 1971, Lichtenthaler und Buschmann 1984). Im Herbst waren die für den Standort Effnerplatz ermittelten Carotinoidkonzentrationen zwar geringer als die, die in den Proben aus dem weniger stickoxidbelasteten Gebiet gefunden wurden, jedoch überschritten die prozentualen Differenzen nicht die Werte

der Standardabweichungen, die gegen Ende des Untersuchungszeitraumes teilweise Werte bis zu 70% annahmen. Diese starken statistischen Schwankungen waren, abgesehen von der relativ geringen Probenzahl, darauf zurückzuführen, daß Blätter von zu unterschiedlicher Gelb- bzw. Grünfärbung zur Pigmentanalytik herangezogen wurden. Hier hätte eine genauere Differenzierung in grün, gelbgrün bzw. gelb erfolgen müssen.

Bei den Xanthophyllen konnten im einzelnen folgende Beobachtungen gemacht werden:

Der relative Gehalt an Antheraxanthin und Luteinepoxid verhielt sich in den Freilandproben genau umgekehrt, als es die im Labor durchgeführten Begasungsversuche erwarten ließen. Er lag in den Proben des Standortes Hirschgarten, der als "Reinluftgebiet" definiert worden war, höher als in den am Effnerplatz genommenen Blattproben.

Da in Fichtennadeln, die bereits optisch als geschädigt eingestuft werden konnten, ein erhöhter relativer Antheraxanthingehalt festgestellt wird (v.d. Ropp 1985) und man auch bei Ozonbegasungen von Koniferen zu analogen Ergebnissen kommt (Lütz, pers. Mitteilung), spricht der Befund, der bei diesen Freilanduntersuchungen gewonnen wurde, gegen eine immissionsbedingte Schädigung der Linden am Effnerplatz.

Zur Analytik der beiden Pigmente muß auch hier angemerkt werden, daß die relativ geringe Peakhöhe sowie die große Halbwertsbreite eine exakte Auswertung erschwerte. Darüber hinaus war die Trennung von Antheraxanthin und Luteinepoxid mit dem verwendeten HPLC-System nicht immer befriedigend, so daß die angegebenen Werte auch mit Unsicherheiten behaftet waren.

Der im Vergleich zu den Kontrollpflanzen gemessene geringere Violaxanthingehalt gegen Ende des Untersuchungszeitraumes stand zunächst im Einklang mit den Befunden, die bei den Laborversuchen gewonnen wurden. Auch hier wurde bei der Begasung mit NO_x eine Pigmentabnahme festgestellt. Bei den

Freilanduntersuchungen war diese Differenz mit ca. 40% - 50% im Herbst am größten, jedoch lagen auch die relativen Standardabweichungen in diesem Bereich, so daß dieser Unterschied nicht als reell gewertet wurde.

Der Luteingehalt war während des gesamten Untersuchungszeitraumes relativ konstant. Die Unterschiede zwischen beiden Standorten lagen unter 20% . Dieser Befund entsprach den Resultaten der Laborversuche, bei denen Lutein selbst bei extrem hohen Schadstoffdosen keine großen Gehaltsänderungen zeigte.

Aus diesen Experimenten geht hervor, daß in Laborversuchen keines der Kriterien, die für eine Schädigung durch Stickoxide ermittelt wurden, in diesem Langzeitversuch mit Freilandpflanzen zutraf.

Das Pflanzenmaterial vom Standort Effnerplatz, der eine vergleichsweise hohe Stickoxidimmission aufweist, zeigte zu keinem Zeitpunkt eine Antheraxanthin- bzw. Luteinepoxidakkumulation oder einen reduzierten Violaxanthingehalt. Folglich muß angenommen werden, daß die in der Umwelt herrschenden NO_x -Immissionenwerte auch bei einer Langzeiteinwirkung keinen Einfluß auf den Pigmentgehalt von Pflanzen hatten.

In diesem Zusammenhang blieb noch die Frage zu klären, ob die Ergebnisse, die bei Kurzzeitbegasungen mit hohen Schadstoffdosen gewonnen wurden, auf Umweltbedingungen übertragbar sind. Runeckles (1974) unterscheidet zwischen einer akuten Begasung mit hohen Dosen, die bis zu 2 Stunden dauern kann, und Langzeiteinwirkungen. Kurzzeitbegasungen sind besonders dann gerechtfertigt, wenn biochemische Veränderungen schnell und signifikant festgestellt werden sollen, die bei Langzeitbegasungen mit niedrigen Dosen nicht mehr drastisch genug ausfallen würden. Laut diesen Aussagen wären die im Labor gewonnenen Ergebnisse durchaus auf den Freilandversuch übertragbar, allerdings sind die in der Umwelt herrschenden Gaskonzentrationen zu gering, um überhaupt noch signifikante Änderungen im pflanzlichen Pigmenthaushalt hervorzurufen.

Der jahreszeitliche Verlauf der Pigmentgehalte wurde, wie erwähnt, für verschiedene Pflanzenarten bereits analysiert (Koch 1976, Kufner et. al. 1978). Die von Benecke (1972) für Grünerlen gefundenen saisonalen Schwankungen der Pigmente β -Carotin, Lutein sowie Chlorophyll stehen im Einklang mit den für Linden ermittelten Daten. Auch hier erreichten die Pigmentgehalte im Juli ein Maximum und nahmen dann unterschiedlich schnell ab. Der Xanthophyllgehalt im Herbst wird ebenfalls größtenteils von Lutein bestimmt. Dies kann durch die vorliegenden Pigmentanalysen der Lindenblätter unabhängig von ihren Standorten bestätigt werden.

Zwischen den ermittelten ortsbedingten Unterschieden in den Pigmentgehalten und einer Schadgaseinwirkung war kein Zusammenhang festzustellen. Diese wurden, außer von experimentellen und jahreszeitlichen Schwankungen, noch von einer Reihe weiterer Parameter beeinflusst, deren Auswirkungen auf die Konzentration von Chlorophyllen und Carotinoiden jedoch im einzelnen nicht getestet wurden.

So können beispielsweise unterschiedliche Lichtverhältnisse zu deutlichen Differenzen führen (Czeczuga 1987), und auch klimatische Differenzen beeinflussen das Ergebnis derartiger Analysen (Hager 1957), jedoch konnten diese auf Grund der relativ geringen Entfernung der beiden Standorte voneinander hier ausgeschlossen werden. Eventuell auftretende tageszeitliche Gehaltsunterschiede wurden von vornherein dadurch ausgeschaltet, daß die Probennahme immer zur selben Zeit, und zwar morgens, erfolgte. Dies hatte darüberhinaus den Vorteil, daß das Pflanzenmaterial nach der Dunkelperiode noch keiner allzu intensiven Sonneneinstrahlung ausgesetzt war, wodurch man sich bessere Chancen für eine Detektion lichtempfindlicher Abbauprodukte ausrechnete.

Auch die morphologischen Besonderheiten der Pflanzen am Effnerplatz, wie kleinere Blätter und Gelbfleckigkeit, lassen sich laut den hier durchgeführten Pigmentanalysen nicht auf eine Schadgaseinwirkung zurückführen. Sie können beispielsweise auch durch die Ausbringung von Streusalz

(Simini und Leone 1986) sowie durch Staubemission (Keller 1985) und Fahrtwind hervorgerufen werden. Insbesondere letzterem wird eine nicht unerhebliche Rolle bei der Reduktion der Blattgröße zugesprochen (Flückinger et al. 1978).

6 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden die direkten und indirekten Reaktionen von Photosynthesepigmenten mit den Gasen SO_2 , NO_x , deren Kombination sowie mit Ozon untersucht. Hierzu wurde zunächst reines Chl a und β -Carotin herangezogen, sodann testete man auch die Auswirkungen der obengenannten Gase auf Thylakoide und Pflanzen. Dabei kam man zu folgenden Erkenntnissen:

1. Eine direkte chemische Reaktion manifestierte sich in erster Linie in einem Ausbleichen der Pigmente. Für Chlorophyll konnten allerdings auch farbige Abbauprodukte detektiert werden.

Die Schwellenwerte für das Auftreten von Ausbleicheffekten lagen zwischen 0 und 10 ppm für Chlorophyll a und zwischen 3 und 150 ppm für β -Carotin, je nach eingesetzter Gasart.

Derivate von Chlorophyll a konnten ab ca. 4 ppm NO_x bzw. 30 ppm SO_2 detektiert werden.

Die Empfindlichkeit von Pflanzen gegenüber Schadgasen war deutlich geringer: hier waren Gaskonzentrationen von ca. 400 ppm für das Einsetzen einer Reaktion nötig. Die verschiedenen getesteten Pflanzenarten zeigten außerdem wenig Unterschied in der Reaktivität, lediglich bei Moosen trat die Reaktion bereits bei der halben oben angegebenen Gasdosis ein.

Das Verhalten der Pigmente gegenüber Schadgasen läßt sich somit folgendermaßen zusammenfassen:

- Oxidativ wirkende Schadgase sowie Gasmischungen führen eher zu einer Pigmentausbleichung als das reduziernd wirkende SO_2 .
- Pflanzen reagieren gegenüber einer Schadgasbelastung sehr viel unempfindlicher als Thylakoide oder die

freien Pigmente.

- β -Carotin ist gegenüber einem Angriff durch NO_x besonders anfällig.
- Der Lichteinfluß verstärkt die Bleichwirkung von Schadgasen.
- Für die Schädlichkeit von Gasen gegenüber Photosynthesepigmenten ergibt sich folgende Reihenfolge:
- Freies Pigment: Chlorophyll und β -Carotin
 $\text{SO}_2 < \text{O}_3 < \text{NO}_x < \text{O}_3/\text{SO}_2, \text{O}_3/\text{NO}_x < \text{SO}_2/\text{NO}_x$
 O_3/NO_x
- Membrangebundenes Pigment:
 Chlorophyll: $\text{NO}_x < \text{SO}_2 < \text{SO}_2/\text{NO}_x$
 β -Carotin: $\text{SO}_2 < \text{NO}_x < \text{SO}_2/\text{NO}_x$
 (Ozon wurde nicht getestet)

2. Nach Abbaupigmenten wurde vor allen unter einer NO_x -Begasung gesucht. Die hierzu benötigten Gaskonzentrationen lagen jedoch weit über den umweltrelevanten Dosen (vergl. Tab. 28, 30).

Für die gefundenen Verbindungen können folgende Strukturvorschläge gemacht werden:

20-Nitrochlorophyll (Struktur I, II)

13²-Hydroxy-20-nitrochlorophyll (Struktur IV)

Komplexierung des Zentralatoms mit NO^{3-} bzw. NO^{2-} (Struktur V).

Eine endgültige Strukturaufklärung wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen.

3. Bei einem Vergleich zwischen Seneszenz, die durch Dunkelstellen der Pflanzen induziert wurde, und NO_x -Exposition stellte man fest, daß erstere mit einem raschen Chlorophyllverlust verbunden war, während die Carotinoide nur langsam abnahmen. Insbesondere Antheraxanthin bzw. Luteinepoxid zeigten im Verlauf der Senes-

zenz einen zunehmenden Anteil am Gesamtpigmentgehalt. Eine Stickoxidbegasung hatte zwar ebenfalls einen Chlorophyllverlust zur Folge, jedoch setzt dieser erst bei einer Gaskonzentration von ca. 400 ppm ein und betrug dann nicht mehr als 20%.

Von den Carotinoiden zeigte neben β -Carotin auch Violaxanthin eine Abnahme um ca. 40%, während der Anteil von Antheraxanthin bzw. Luteinepoxid wie bei der Seneszenz anstieg. Diese Tatsache wurde mit dem Auftreten des Violaxanthincyclus während einer Begasung erklärt. Bei der Seneszenz ergaben sich jedoch keine Hinweise darauf.

4. Die Beeinflussung der Chlorophyllbiosynthese durch Schadgase wurde im Vergleich mit den Wirkungen von 2, 2'-Bispyridin vorgenommen. Diese Substanz führte besonders bei 50 h altem etioliertem Hafer zu einer Akkumulation von Chlorophyllvorstufen. Auf Grund der photosensibilisierenden Eigenschaften dieser Verbindungen kam es besonders bei 50 h altem Hafer zu einem starken Chlorophyllverlust und zu einem Absterben der Pflanzen. 72 h alter Hafer reagierte unter diesen Versuchsbedingungen weniger empfindlich. Bei einer Begasung mit 200 ppm NO_x kam es ebenfalls zu einer leichten Porphyrinakkumulation, jedoch verlief die Biosynthese unter Belichtung normal.

Durch Veresterungsversuche ergaben sich Hinweise darauf, daß die Störung der Chlorophyllbiosynthese unter Einwirkung von 2, 2'-Bispyridin auf eine verringerte Synthetaseaktivität zurückgeführt werden kann. Begasungsversuche mit ca. 5 ppm SO_2 , NO_x und SO_2/NO_x führten jedoch diesbezüglich zu keiner Beeinflussung.

5. Direkte chemische Reaktionen konnten nur bei Einwirkung hoher Schadgasdosen detektiert werden. Aus diesem Grund führte man während einer gesamten Vegetationsperiode Pigmentanalysen an Freilandpflanzen durch, um zu testen, ob bei einer längeren Einwirkung geringer Schadgasdosen möglicherweise indirekte Reaktionen auftreten.

Zwischen den Pflanzen aus der NO_x -belasteten Zone (Effnerplatz) und den Kontrollpflanzen (Hirschgarten) konnten weder qualitative noch quantitative Pigmentdifferenzen ermittelt werden, die auf einen Schadgaseinfluß hingedeutet hätten. Es zeigten sich lediglich jahreszeitlich bedingte Schwankungen.

7 Literaturverzeichnis

- Alcubilla, M., Heibl, R. und Rehfuess, K. E. (1985)
 Standortkundliche Studien zum Tannensterben. Organische
 Inhaltsstoffe in den Nadeln befallener und gesunder
 Probeebäume.
Forstw. Cbl., 104, 300 - 312
- Aldinger, E. und Kermer, W. L. (1985)
 Zuwachsuntersuchungen an gesunden und geschädigten Tannen
 und Fichten auf alten Praxiskalkungsflächen
Forstw. Cbl., 104 (6), 360 - 373
- Alscher, R., Bower, J. L. und Zipfel, W. (1987)
 The basis of different sensitivities of photosynthesis to
 SO_2 in two cultivars of pea
J. Exp. Bot., 38 (186), 99 - 108
- Ammer, U., Mössmer, E. - M. und Schirmer, R. (1985)
 Vitalität und Schutzbefähigung von Bergwaldbeständen im
 Hinblick auf das Waldsterben
Forstw. Cbl., 104 (2), 122 - 157
- Anderson, J. M. (1973)
 The molecular organisation of chloroplast thylakoids
Biochim. Biophys. Acta, 416, 191-235
- Appt, M., Reich Ch. und Scheuermann, A. (1983)
 Höhenzuwachsentwicklung bei Immissionsschäden von Fichte
 und Tanne
AFZ, 38, 368

Arndt, U. (1971)

Konzentrationsänderungen bei Blattfarbstoffen unter dem Einfluß von Luftverunreinigungen. Ein Diskussionsbeitrag zur Pigmentanalyse

Environ. Poll., Ser. A, 37-48

Athari, S. (1983)

Zuwachsvergleich von Fichten mit unterschiedlich starken Schadsymptomen

AFZ, 26/27, 635 - 655

Bartels, H. (1985)

Morphologische Kriterien der neuartigen Waldschäden

Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich, Nr. 369, 318 - 322

Bartsch, N. und Dorenbusch (1981)

Immissionsbelastungen von Ökosystemen

Der Forst- und Holzwirt, 23, 614 - 617

Bahl, J. (1977)

Chlorophyll, carotenoid and lipid content in triticum savitum L. Plasid envelops, prolamellar bodies, stroma lamellae and grana

Planta, 136, 21 - 24

Basolo, F. und Pearson, R. G. (1973)

Mechanismen in der anorganischen Chemie, 313

Thieme Verlag Stuttgart

Bell, J. N. B. (1984)

Air pollution problems in Western Europe

In: Koziol, M. J. (Hrsg), Gaseous air pollutants and plant metabolism, S. 3 - 24

Butterworth Sci. Press London

Benecke, U. (1972)

Wachstum, CO₂-Gaswechsel und Pigmentgehalt einiger
Baumarten nach Ausbringung in verschiedene Höhenlagen
Angew. Botanik, 46, 117 - 135

Beroza, M. und Bierl, B. A. (1967)

Rapid determination of olefin position in organic
compounds in microgram range by ozonolysis and gas
chromatography
Z. Anal. Chem., 39 (10), 1131-1135

Biswal, U. C. und Biswal, B. (1984)

Photocontrol of leaf senescence
Photochem. Photobiol., 39, 875 - 879

Blaschke, H., Brehmer, U. und Schwarz, H. (1985)

Wurzelschäden und Waldsterben - Zur Bestimmung
morphologischer Kenngrößen von Feinwurzelsystemen mit dem
IBAS - erste Ergebnisse
Forstw. Cbl., 104 (5), 199 - 205

Boardman, N. K. (1966)

Protochlorophyll
In: Vernon, L. D. und Seeley G. R. (Hrsg.), The
Chlorophylls, 437 - 479
Academic Press London, New York

Bode, J., Kühn, H.-P. und Wild, A. (1985)

Die Akkumulation von Prolin in Nadeln geschädigter Fichten
Picea abies
L. Karst
Forstw. Cbl., 104, 353 - 360

Bonnett, R. und Stephenson, G.F., (1965)

The meso reactivity of porphyrins and related compounds
J. Org. Chem., 30, 2791

Bosch, C., Pfannkuch, E., Baum, U. und Rehfuess, K. E. (1983)

Über die Erkrankung der Fichte (*Picea abies* Karst.) in den Hochlagen des bayer. Waldes

Forstw. Cbl., 102, 167 - 181

Braun, H. und Sauter, J. J. (1983)

Unterschiedliche Symptome des "Waldsterbens" im Schwarzwald - mögliche Kausalketten und Basis - Ursachen

AFZ, 26/27, 656 - 658

Brinkmann, E., Lüttge, U. und Fischer, K. (1972)

Die Wirkung von SO_2 und Bisulfitverbindungen auf Photosynthese, Ionentransport und Spaltöffungsverhalten bei Blättern von höheren Pflanzen

Ber. Dtsch. Bot. Ges., 84, 523-524

Britton, G., (1976)

Biosynthesis of carotenoids

In: Goodwin, T. G. (Hrsg.), Chemistry and biochemistry of plants, Vol. 1, 262

Academic Press London New York

Brown, J. S. (1987)

Functional organisation of chlorophyll a and carotenoids in the alga *Nannochloropsis salina*

Plant Physiol., 83, 434 - 437

Bushnell, W. R. und Rowell, J. B. (1981)

Suppressors of defense reactions: a model for roles in specificity

Phytopathology, 71, 1012 - 1014

Butin, H. und Wagner, C. (1985)

Mykologische Untersuchungen zur Nadelröte der Fichte

Forstw. Cbl., 104, 178 - 186

Carlson, R. W. (1983)

Interactions between SO_2 and NO_x and their effects on photosynthetic properties of soybean Glycino Max.

Environ. Poll., 32 (Ser. A), 11-38

Castelfranco, P. A. und Beale, S. I. (1981)

Chlorophyll Biosynthesis

In: Heath, M. D. und Boardman, N. K. (Hrsg.), The Biochemistry of Plants, Vol. 8, 375 - 421

Academic Press, Inc. New York

Chang, C. W. und Heggestad, H. E. (1974)

Effects of ozone on photosystem II in *Spinacia Olerata* Chloroplasts

Phytochem., 13, 871 - 873

Chevone, B. I., Herzfeld, D. E., Krupa, J. V. und Cappelka, A. H (1986)

Direct effects of atmospheric sulfate on vegetation

JAPCA, 36, 813-815

Chichester, C. O. und Nakayama, T. O. (1965)

Pigment changes in senescent and stored tissue

In: Goodwin, T. W. (Hrsg.), Chemistry and Biochemistry of Plants, 439 - 458

Academic Press London New York

Choe, H. T. und Thimann, K. V. (1975)

The metabolism of oat leaves during senescence III. The senescence of isolated chloroplasts

Plant Physiol., 55, 828 - 834

Christen, H. R. (1977)

Grundlagen der organischen Chemie, Seite 379

Sauerländer-Diesterweg Salle Frankfurt, Berlin, München

Christen, H. R. (1977a)

Grundlagen der organischen Chemie, Seite 201

Sauerländer-Diesterweg Salle Frankfurt, Berlin, München

Cotton, F. A. und Wilkinson, G. (1982)

Anorganische Chemie, 176

Verlag Chemie Weinheim

Czeczuga, B. (1987)

Carotenoid contents in leaves grown under various light intensities

Biochem. Syst. Ecol., 15, 523-527

Davies, B. H. (1976)

Carotenoids

In: Goodwin (Hrsg.), Chemistry and biochemistry of plant pigments, 154

Academic Press London, New York, San Francisco

Demmig, B., Winter, K., Krüger, A. und Czygan, F.-C. (1987)

Photoinhibition and Zeaxanthininformation in intact leaves

Plant Physiol., 84, 218 - 224

Duggan, J. M. und Gassman, M. L. (1974)

Induction of porphyrin synthesis in etiolated bean leaves by chelators of iron

Plant Physiol., 53, 206 - 215

Dupont, J. und Siegenthaler, P. A. (1986)

A parallel study of pigment bleaching and cytochrome breakdown during aging of thylakoid membranes

Plant and Cell Physiol., 27, 473-484

Eastham, A. und Omrod, D. P. (1986)

Visible injury and growth responses of young cuttings of *populus canadensis* and *p. nigra* to nitrogen dioxid and sulphur dioxide

Can. Jour. For. Res., 16, 1289-1292

Eichenberger, W. und Grob, E. C. (1962)

Beiträge zur Biochemie der pflanzlichen Plastiden.
1.Mitteilung Zur Kenntnis der Herbstfärbung

Helv. Chim. Acta (Vol. XLV) (Fasc. III), 974 - 981, No. 110

Elkinawy, M. (1984)

Hormonal changes associated with leaf senescence in cotton (*Gossypium barbadense*)

Physiol. Plant., 62, 593 - 598

Elstner, E. (1983)

Baumkrankheiten und Baumsterben

Naturwiss. Rundsch., 9, 381-388

Elstner, E. (1983a)

Probleme der Peroxide

GSF-Bericht A 3/83: "SO₂ und die Folgen"

Neuherberg, München

Elstner, E. F. (1984)

Schadstoffe, die über die Luft zugeführt werden

In: Hock, B. und Elstner, E. F.

Pflanzentoxikologie (Der Einfluß von Schadstoffen und Schädwirkungen auf Pflanzen), 67 - 94

Bibliographisches Institut Mannheim, Wien, Zürich

Faller, N., Herwig, K. und Kühn, H. (1970)

Die Aufnahme von Schwefeldioxid aus der Luft I. Einfluß
auf den pflanzlichen Ertrag II. Aufbau, Umbau und
Verteilung in der Pflanze

Plant and Soil, 33, S 177-191, 283-295

Firn, R. D. und Friend, J. (1972)

Enzymatic production of the plant growth inhibitor
Xanthoxin

Planta, 103, 263 - 266

Fischer, H. und Fröwies, W. (1931)

Synthese von Oxypyrrromethenen und über einige Derivate
des Koproporphyrins I

Z. physiol. Chemie, 195, 49 - 80

Fischer, H. und Hilger, J. (1925)

Zur Kenntnis der natürlichen Porphyrine XVIII. Mitteilung
Neue Überführung von Uro- in Koproporphyrin und über
einige Derivate dieser Porphyrine

Z. physiol. Chemie, 149, S. 65 - 70

Fischer, H., Orth, H. (1940)

Die Chemie des Pyrrols, 389 - 397

Akademische Verlagsanstalten Leipzig

Flückiger, W., Oertli, J. J. und Flückiger-Keller, H. (1978)

The effect of wind gusts on leaf growth and foliar water
relations of aspen

Oecologia, 34, 101-106

Frank, H. und Frank, W. (1985)

Chlorophyll-bleaching by atmospheric pollutants and
sunlight

Naturwiss., 72, S. 139 - 141

French, C. S. (1960)

The chlorophylls in vivo and in vitro

In: Frank, C. S. und Ruhland, W. (Hrsg.),

Handbuch der Pflanzenphysiologie, 5/1, 279 - 280

Springer Verlag Berlin, Göttingen, Heidelberg

Fuhrhop, J.-H. (1978)

Irreversible reactions on the periphery

In: Dolphin, D. (Hrsg.), The Porphyrins, Vol. II, 131 - 156

Academic Press New York London

Gassman, M. L. und Duggan, J. M. (1974)

Chemical induction of porphyrin synthesis in higher plants

In: Avron, M. (Hrsg.), Proc. Third Congr. Photosynthesis, Rehovot, Israel, 2105 - 2113

Elsevier Amsterdam

Gowin, T. und Goral, I. (1977)

Chlorophyll and pheophytin content in needles of different age of trees growing under conditions of chronic industrial pollution

Acta Societatis Botanicorum Poloniae, XLVI (1), 151 - 159

Granik, S. (1961)

Magnesium protoporphyrin monomethylester and protoporphyrin monomethylester in chlorophyll biosynthesis
J. Biol. Chem., 236, 1168 - 1172

Granik, S. (1963)

The pigments of the biosynthetic chain of chlorophyll and their interactions with light

In: Sissakian, N. M. (Hrsg.), Fifth Int. Congr. Biochem. Moscow Vol. V, S. 71 - 141

Academic Press New York

Greim, H., Senger, J. (1985)

Untersuchungen des Einflusses von Luftschadstoffen auf das
pflanzliche Detoxifizierungssystem
Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich, 369,
80 - 91

Griffith, W. T. (1974)

Source of reducing equivalents for the in vitro synthesis
of chlorophyll from protochlorophyll
FEBS Lett., 46, 301 - 304

Griffith, W. T. (1978)

Reconstitution of chlorophyllide-formation by isolated
etioplast membranes
Biochem. J., 174, 681 - 692

Grimes, H. D., Perkins, K. K. und Boss, W. F. (1982)

Ozone degrades into hydroxyl radical under physiological
conditions
Plant Physiol., 72, 1016 - 1020

Grosch, W., Laskawy G. (1979)

Cooxidation of carotenes requires one soybean lipoxygenase
isoenzyme
Biochim. Biophys. Acta, 575, 439-445

Guderian, R. (1985)

Die Wirkung von Ozon und Stickoxiden
In: Beiträge zum IMA-Querschnittsseminar vom 2.-4.12.1985
in der Kernforschungsanlage in Jülich, 366 - 382

Guderian, R. und Tingey, D. T. (1986)

Notwendigkeit und Ableitung von Grenzwerten für Stickoxide
Forschungsbericht 1067055 Umweltbundesamt Berlin

- Gut, H., Rutz, Ch., Matile, Ph. und Thomas, H. (1987)
 Leaf senescence in a nonyellowing mutant of *Festuca pratensis*:
 Degradation of carotenoids
Physiol. Plant., 70, 659-663
- Hager, A. (1957)
 Über den Einfluß klimatischer Faktoren auf den
 Blattfarbstoffgehalt höherer Pflanzen
Planta, 49, 525-560
- Hager, A. (1967)
 Untersuchungen über die Rückreaktion im Xanthophyll-Cyclus
 bei *Chlorella*, *Spinacia* und *Taxus*
Planta, 76, 138 - 149
- Hager, A. und Meyer-Bertenrath, T. (1966)
 Die Isolierung und quantitative Bestimmung der Carotinoide
 und Chlorophylle von Blättern, Algen und isolierten
 Chloroplasten mit Hilfe dünnschichtchromatographischer
 Methoden
Planta (Berl.), 69, 198 - 217
- Hanfstingl, U., (1987)
Diplomarbeit, Universität München
- Haslberger, P. (1986)
Diplomarbeit, Universität München
- Heath, R. L (1980)
 Initial events in injury to plants by air pollutants
Ann. Rev. Plant Physiol., 31, 395-431

Heath, R. L. (1979)

Breakdown of ozone and formation of H_2O_2 in aqueous solutions of amine buffers exposed to ozone

Toxicol. Lett., **4**, 449-453

Helenius, A. und Simons, K. (1975)

Solubilisation of membranes by detergents

BBA, **415**, 29 - 79

Helenius, A., Mccasein, E., Fries, C. und Tanford, R. (1979)

Properties of detergents

Meth. Enzym., **56**, 734 - 749

Hildebrand, D. F. und Hymowitz, T. (1982)

Carotenoid and chlorophyll bleaching by soybeans with and without seed lipoxxygenase-1

J. Agric. Food Chem., **30**, 705 - 708

Hoigné, J. und Bader, H. (1975)

Ozonisation of water: role of hydroxyl radicals as oxidation intermediates

Science, **190**, 782 - 784

Holden, M. (1965)

Chlorophyll bleaching by legume seeds

J. Sci. Fd. Agric., **16**, 312 - 325

Hollemann, A. F. und Wiberg, E. (1976)

Lehrbuch der anorganischen Chemie, 410

De Gruyter Berlin, New York

Holt, A. S. (1958)

The phase test intermediates and the allomerisation of chorophyll a Can. J. Biochem. Physiol., **36**, 439

Holt, A. S. (1966)

Recently characterized chlorophylls 1966

In: Vernon, L. P. und Seely, G. R. (Hrsg.), The Chlorophylls, 112 - 116

Academic Press New York London

Hopf, F. R. und Witten, D. G. (1978)

Chemical transformations involving photoexcited porphyrins and metalloporphyrins

In: Dolphin, D. (Hrsg.), The Porphyrins, Vol. II, 161 - 165

Academic Press New York London

Hoque, E. (1982)

Biochemical aspects of stress physiology of plants and some considerations of defense mechanisms in conifers

Europ. J. Foerst Path., 12, 280 - 296

Horntvedt, R. (1983)

seasonal variations in dry weight, chlorophyll and soluble carbohydrate content of Norway spruce needles (*Picea abies* L. Karst)

Norsk institut for skogforskning (Hrsg.),

Reports of the Norwegian forest research institute, 1 - 14

Hynninen, P. H. und Lötjönen, S. (1981)

Electrophilic substitution at the δ -methine bridge of pheophorbide a and a'

Tetrahedr. Lett., 22 (19), 1845 - 1846

Imamura, M. und Shimizu S. (1974)

Metabolism of chlorophyll in higher plants VI. relationship between fatty acid oxidation and chlorophyll bleaching in plant extracts

Plant and Cell Physiol., 15, 187-190

Iriyama, K. und Shiraki, M. (1979)

An improved method for extraction, partial purification, separation and isolation of chlorophyll from spinach leaves
J. Liq. Chrom., **2**, 255 - 276

Isenring, H. P., Zas, E., Smith, K., Falk, H., Luisier, J. L. und Eschenmoser, A. (1975)

Über enolisierte Derivate der Chlorophyllreihe
13²-Desmethoxycarbonyl 17³-desoxy- 13², 17³-cyclochloro-
phyllid α -enol und eine Methode zur Einführung von Magnesium in porphinoide Ligandensysteme unter milden Bedingungen
Helv. Chim. Acta, **58** (8), 2357 - 2367 (254 - 255)

Jäger, H.-J. und Klein, H. (1980)

Biochemical and physiological effects of SO₂ on plants
Angew. Bot., **54**, 337-348

Jäger, H.-J., Weigel, H.-J. und Grünhage L. (1986)

Physiologische und biochemische Aspekte der Wirkung von Immissionen auf Waldbäume
Eur. J. For. Path., **16**, 98 - 109

Jurat, R., Schaub, H., Stienen, H. und Bauch, J. (1986)

Einfluß von Schwefeldioxid auf Fichten (*Picea abies* [L.] Karst.) in verschiedenen Bodensubstraten
Forstw. Cbl., **105**, 105 - 115

Kändler, U. und Ulrich, H., (1963)

Nachweis von NO₂-Schäden an Blättern
Naturwiss., **51**, 518

Kandler, O. (1983)

Waldsterben, Emissions- oder Epidemiejhypothese?
Naturwiss. Rundsch., **36**, 488 - 490

Kandler, O. (1985)

Immissionsversus Epidemie-Hypothesen

In: Kortzfleisch, G. V. (Hrsg.): Waldschäden: Theorie und Praxis auf der Suche nach Antworten, Oldenbourg-Verlag München, 19 - 59

Kandler, O., Miller, W. und Ostner, R. (1987)

Dynamik der "akuten Vergilbung" der Fichte:
Epidemiologische und physiologische Befunde

AFZ, 27/28/29, 715 - 723

Kaplan, D. M., Luchtel, D. L. und McJilton, C. E. (1974)

Chronic exposure to SO_2 : Possible effects at the cellular level

Environm. Letters, 7, 303-310

Kardish, N., Ronen, R., Bubrick, P. und Garty, J. (1987)

The influence of air pollution on the concentration of ATP and on chlorophyll degradation in the lichen *Ramalina Duriaei* (DE. NOT.) BAGL.

New Phytol., 106, 697-706

Katz, J. J., Shipman, L. S., Cotton, T. M. und Janson, T. R. (1978)

Chlorophyll aggregation: coordination interactions in chlorophyll monomers, dimers and oligomers

In: Dolphin, D. (Hrsg.), The Porphyrins, Vol. IV, 401 - 458

Academic Press New York London

Keller, Th. (1985)

Auswirkungen der Straßenrandbedingungen auf physiologische Aktivitäten der Fichte

Forstw. Cbl., 104, 312-318

- Khan, A. A. und Malhotra, S. S. (1977)
Effects of aqueous sulfurdioxide on pine needle glycolipids
Phytochemistry, 16, 539-543
- Koch, W. (1976)
Blattfarbstoffe von Fichten(Picea abies (L.) Karst.) in Abhängigkeit vom Jahresgang, Blattalter und -typ
Photosynthetica, 10, 280-290
- Krahl-Urban, B. und Papke, H. E. (1987)
Wissenschaftliche Expedition in die Waldschadensgebiete
In: Projektträger für Biologie, Ökologie und Energie der Kernforschungsanlage Jülich GmbH
Waldschäden, 6 - 11
- Krapfenbauer, A. (1984)
Luftverunreinigungen - Folgewirkungen - Tendenzen der Ausweitung
Allgemeine Forstzeitung (Wien), 95, 62 - 64
- Krause, G. H. M. und Prinz, B. (1985)
Zur Wirkung von Ozon und saurem Nebel (einzel und in Kombination) auf phänomenologische und physiologische Parameter an Nadel und Laubgehölzen im kombinierten Begasungsexperiment
Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich, 369, 208 - 218
- Kreutzer, K. (1979)
Bodenkundliche und ernährungsphysiologische Untersuchungen zum Kiefernsterben im Raum Ingolstadt - Kehlheim
In: Bayerisches Landesamt für Umweltschutz (Hrsg.)
Schriftenreihe Naturschutz und Landschaftspflege,
Immissionswirkungen an Pflanzen, 45 - 54
R. Oldenbourg Verlag München/Wien

Krinsky, N. J. (1966)

The role of carotenoid pigments as protective agents against photosensitized oxidations in chloroplasts

In: Goodwin, T. E. (Hrsg.), Biochemistry of chloroplasts, 423

Academic Press New York San Francisco London

Kufner, R., Czygan, F.-C. und Schneider, L. (1978)

Veränderungen des Pigmentgehaltes und der Ultrastruktur bei den Plastiden der Nadelblätter von *Taxus baccata* (L.) während ihrer Entwicklung

Ber. Dtsch. Bot. Ges., 91, 325-337

Kunert, K. J. (1985)

Peroxidation von Membranlipiden - ein Hinweis auf physiologische Wirkungsmechanismen in geschädigten Waldbäumen

AFZ, 35, 912

Kura-Hotta, M., Satoh, K. und Katoh, S. (1987)

Relationship between photosynthesis and chlorophyll content during leaf senescence of rice seedlings

Plant and Cell Physiol., 28, 1321 - 1329

Larcher, W. (1987)

Stress bei Pflanzen

Naturwiss., 74, 158-167

Latham, P. S. und Bloomer, I. R. (1983)

Protoporphyrin-induced photodamage studies using cultured skin fibroblasts

Photochem. Photobiol., 37, 553 - 557

- Leffler, H. R. und Cherry, J. H. (1974)
 Destruction of enzymatic activities of corn and soybean
 leaves exposed to ozone
Can. J. Bot., 52, 1233-1238
- Lendzian, K. J. (1987)
 Aufnahmen und zellphysiologische Wirkungen von
 Luftschadstoffen
Naturwiss., 74, 282-288
- Lewandowska, M. und Jarvis, P. G. (1977)
 Changes in chlorophyll and carotenoid content, specific
 leaf area and dry weight fraction in Sitka spruce, in
 response to shading and season
New Phytol., 79, 247-256
- Lichtenthaler, H. K. und Buschmann, C. (1984)
 Photooxidative changes in pigment composition and
 photosynthetic activity of air polluted spruce needles
 (Picea Abies C.)
 In: Sybesma, C. (Hrsg.), Advances in photosynthesis
 research, Vol 4 Martinus Nijhoff/Dr W. Junk Publishers,
 The Hague/Boston/Lancaster
- Lichtenthaler, K. H., Buschmann, C. (1984a)
 Beziehungen zwischen Photosynthese und Baumsterben
AFZ, 39, 12-16
- Lüthke-Brinkhaus und Kleinig, H. (1987)
 Carotenoid and chlorophyll biosynthesis in isolated
 plastids from mustard seedling cotyledons (sinapis alba
 L.) during etioplast - chloroplast conversion
Planta, 170, 121 - 129

Lüthy, B., Matile, P. und Thomas, H. (1986)

Oxidation activity in thylakoid membranes

J. Plant Physiol., 123, 169-180

Lüttge, U., Osmond, C. P., Ball, E., Brinkmann, E. und
Keinze, G. (1972)

Bisulfite compounds as metabolic inhibitors: nonspezifische
effects on membranes

Plant and Cell Physiol., 13, 505-514

Mackinney, G. und Chichester, C.O. (1960)

In: Allen, M.P. (Hrsg.),

Comparative Biochemistry of photoreactive systems, 205 -
214

Academic press New York London

Malhotra, S. S. und Hocking, D. (1976)

Biochemical and cytological effects of sulfur dioxide on
plant metabolism

New Phytol., 76, 227 - 237

Mansfield, T. A. (1973)

The role of stomata in determining the responses of plants
to air pollutants

Comm. Plant. Sci., 2, 11-20

Mantoura, R. F. C. und Llewellyn, C. A. (1983)

The rapid determination of algal chlorophyll and
carotenoid pigments and their breakdown products in
natural waters by reverse-phase HPLC

Anal. Chim. Acta, 151, 297 - 314

March, J. (1983)

Advanced organic chemistry / Reactions, mechanisms and
structures, 704

McGraw Hill Int. Book Company

- Marciniak, B., Bucholc, M. und Buchowicz, J. (1987)
Early DNA-synthesis during the germination of wheat embryos
Phytochemistry, 26, 331 - 334
- Markwell, J. P., Thornber, J. P. und Boggs, R. T. (1979)
Higher plant chloroplasts: evidence that all the chlorophyll exists as chlorophyll-protein complexes
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1233 - 1235
- Martin, A. und Barber, F. R. (1984)
Acid gases and acid in rain monitored for over 5 years in rural east-central England
Atmosph. Environ., 18, 1715-1724
- Maunder, M. J., Brown, S. B. und Woolhouse, H. W. (1983)
The appearance of chlorophyll derivatives in senescing tissues
Biochemistry 22 (11), 2443 - 2446
- McFeeters, R.F., Chichester, C.O. und Whitaker, J.R. (1971)
Purification and properties of chlorophyllase from *Ailantus Altissima* (Tree-of-Heaven)
Plant Physiol., 47, 609-618
- Mehlhorn, H., Seufert, G. und Schmidt, A. (1986)
Effects of SO₂ and O₃ on production of antioxidants in conifers
Plant Physiol., 82, 336-338
- Merzliak, M. N. und Kovrizhnikh, V. A. (1986)
Allomerisation of chlorophyll in pea plants treated with Diquat and fumigated with SO₂: Possible participation of free radical reactions in pigment degradation
J. Plant Physiol., 123, 503-506

Merzliak, M. N., Kuprianowa, V. A., Kovrizhnikh, V. A. und Afanas, L. B. (1985)

The allomerisation of chlorophylls a and b with superoxide anion

J. Inorg. Biochem., 24, 239-242

Merzlyak, M. N. und Kovrizhnikh, V. A. (1984)

Chlorophyll allomerisation in the systems containing free radicals, and under illumination of isolated chloroplasts

Stud. Biophys., 102, 81-88

Meyer, F. H. (1984)

Baumschaden in Landschaft und Stadt

Landschaft und Stadt, 16 (1/2), 9 - 18

Mies, E. und Zottl, H. W. (1985)

Zeitliche Änderung der Chlorophyll- und Elementgehalte in den Nadeln eines gelb-chlorotischen Fichtenbestandes

Forstw. Cbl., 104, 1-3

Misra, A. N. und Biswal, U. C. (1981)

Changes in chlorophylls and carotenoids during aging of attached and detached leaves and of isolated chloroplasts of wheat seedlings

Photosynthetica, 15, 75 - 79

Mohr, H. (1984)

"Baumsterben" als pflanzenphysiologisches Problem

Biologie in unserer Zeit, 4 (14), 103 - 110

Mohr, H. (1986)

Die Erforschung der neuartigen Waldschaden

Biologie in unserer Zeit, 3 (16), 83 - 89

Molisch, H. (1986)

Eine neue mikrochemische Reaktion auf Chlorophyll
Ber. Dtsch. Bot. Ges., 14, 16

Montalbini, P., Koch, F., Buba, M. und Elstner, E.F. (1978)

Increase in lipid dependent carotene destruction as compared to ethylene formation and chlorophyllase activity following mixed infection of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) with beet yellow virus and beet mild yellow virus
Physiol. Plant Pathol., 12, 211-223

Moreland, D. E. und Novitzky, W. P. (1987)

Interference by herbicides with the transmembrane potential of thylakoids
Z. Naturforsch., 42c, 718 - 726

Müller, J. (1957)

Spezifischer Nachweis von NO_2 -Schäden an Pflanzen mit Hilfe von Blattpigmentanalysen
Naturwiss., 44, 453

Murray, A. J. S. (1984)

Light effects the deposition of NO_2 to the Flacca mutant of tomatoe without affecting the rate of transpiration
New Phytol., 98, 447-450

Nash, T. (1970)

Absorption of nitrogen dioxide by aqueous solutions
J. Chem. Soc., 7, 3023-3024

Omrod, D. P. (1982)

Air pollutant interactions in mixtures
In: Unsworth, M.M.; Omrod, D.P. (Hrsg.)
Effects of gaseous air pollution in agriculture and horticulture, 169 - 187
Butterworth Sci. Press, London

Osswald, W. F. und Elstner, E. F. (1986)

Mechanismen der pathologischen Pigmentbleichung bei Pflanzen

Ber. Dtsch. Bot. Ges., 99, 341 - 365

Papke, H. E., Krahel-Urban, B. und Schimansky, Chr. (1987)

Forschungsschwerpunkte und deutsch-amerikanische Zusammenarbeit In: Projektträgerschaft für Biologie, Ökologie und Energie der Kernforschungsanlage Jülich

Waldschäden, 126 - 127

Pauls, K. P. und Thompson, J. E. (1981)

Effects of in vitro treatment with ozone on the physical and chemical properties of membranes

Physiol. Plant., 53, 255-262

Peiser, G. D. und Young, S. F. (1977)

Chlorophyll destruction by the bisulfit-oxygen system

Plant Physiol., 60, 277-281

Peiser, G.D. und Young, S.F. (1978)

Chlorophyll destruction in the presence of bisulfit and linolenic acid hydroperoxide

Phytochemistry, 17, 79-84

Pfanz, H. und Heber, U. (1986)

Buffer capacities of leaves, leaf cells, and leaf cell organelles in relation to fluxes of potentially acidic gases

Plant Physiol., 81, 597 - 602

Pitt, J. N. und Finlayson, B. J. (1975)

Mechanismen der photochemischen Luftverschmutzung

Angew. Chem., 87, 18 - 33

Prinz, B. (1983)

Gedanken zum Stand der Diskussion über die Ursachen der
Waldschäden in der Bundesrepublik Deutschland
Der Forst- und Holzwirt, 18, 460 - 467

Prinz, B., Krause, G. H. M. und Stratmann, H. (1982)

Waldschäden in der Bundesrepublik Deutschland
LIS-Berichte, 28

Pryor, W. A. und Lightsey, J. W. (1981)

Mechanisms of nitrogen dioxide reductions: Initiation of
the lipid peroxide peroxidation and the production on
nitrous acid
Science, 214, 435 - 437

Puckett, K., Niebor, E., Flora, W. P. und Richardson, D. S.
H. (1973)

Sulfurdioxide: Its effect on photosynthetic ^{14}C -fixation
and suggested mechanism of phytotoxicity
New Phytol., 72, 141-154

Raven, P. H., Evert, R. F. und Curtis, H. (1985) Moose
(Bryophyta)

In: Raven, P. H., Evert, R. F. und Curtis, H. (Hrsg.),
Biologie der Pflanzen, 311 - 329
De Gruyter Verlag Berlin, New York

Rebelz, C. A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H. J. und Wu, S.
M. (1984)

Photodynamic herbicides: 1. Concepts and phenomenology
Enzyme Microb. Technol., 6, 390 - 401

Rehfuess, K. E. (1983)

Walderkrankungen und Immissionen - eine Zwischenbilanz
AFZ, 38, 601 - 610

Rehfuess, K. E., (1987a)

Untersuchungsstandort: Höhenkirchener Forst Schäden an Fichten

Projektträgerschaft für Biologie, Ökologie und Energie der Kernforschungsanlage Jülich GmbH (Hrsg.), Waldschäden, 80 - 81

Rehfuess, K. E. (1987)

Untersuchungsstandort Elendalm: Schäden an Fichten

Projektträgerschaft für Biologie, Ökologie und Energie der Kernforschungsanlage Jülich GmbH (Hrsg.), Waldschäden, 84 - 87

Reinert, R. A., Heagle, A. S. und Heck, W. W. (1975)

Plant responses to pollutant contributions

In: Mudd, J. B. und Kozlowski, T. T. (Hrsg.), Responses of plants to air pollution, 273 - 280

New York academic press

Röben, M. und Dörries, W. (1932)

Einige Versuche über den Einfluß von schwefliger Säure auf *Elodea canadensis*

Ber. dtsch. bot. Ges., 50, 53 - 58

Ropp v. d., I (1985)

Diplomarbeit, Universität München

Rowland, A., Murray, A. J. S. und Wellburn, A. R. (1985)

Oxides of nitrogen and their impact upon vegetation

Reviews on Environmental Health, 4, 295 - 341

Rowland, A. J., Drew, M. C. und Wellburn, A. R. (1987)

Foliar entry and incorporation of atmospheric nitrogendioxide into barley plants of different nitrogen status

New Phytol., 107, 357-371

Rudolf, E. (1979)

Wirkungen von Luftverunreinigungen auf pflanzliche Indikatoren in Bayern In: Bayerisches Landesamt für Umweltschutz (Hrsg.)

Schriftenreihe Naturschutz und Landschaftspflege

Immissionswirkungen an Pflanzen, 7-45

R. Oldenbourg Verlag München Wien

Rüdiger, W., Benz, J. und Guthoff, Ch. (1980)

Detection and partial characterisation of activity of chlorophyll synthetase in etioplast membranes

Eur. J. Biochem., 109, 193 - 200

Rüdiger, W., Hedden, P., Köst, H.-P. und Chapman, D. J. (1977)

Esterification of chlorophyllide by GGPP in a cell free system from maize shoots

Biochem. Biophys. Research Comm., 74, 3

Rühle, W. und Wild, W., (1985)

Die Anpassung des Photosyntheseapparates höherer Pflanzen an die Lichtbedingungen

Naturwiss., 72, 10-16

Runeckles, V. C. (1974)

Dosage of air pollutants and damage to vegetation

Environ. Conserv., 1, 305-308

Scheer, H., (1978)

Synthesis and stereochemistry of hydroporphyrins

In: Dolphin, D. (Hrsg.), The Porphyrins, Vol. 2, 1 - 44

Academic Press, New York London

Scheer, H., Gross, E., Nitsche, B., Cmiel, E., Schneider, S., Schäfer, W., Schiebel, H.-M. und Schulten, H.-R., (1986)
 Structure of Methylpheophorbide-RC I
Photochem. Photobiol., **43**, 559 - 571

Scheer, H. und Inhoffen, H. H. (1978)
 In: Dolphin, D. (Hrsg.), The Porphyrins, Vol. 2
 Hydroporphyrins, 64 - 66
 Academic Press New York, San Francisco, London

Schenk, G. O. (1985)
 Is the new forest decline a photodynamic disease caused by light and peroxyacetylnitrate, ozone, halocarbons and others?
EPA Newsletters, Apr./June, 15 - 41

Schmidt, A. und Kuhnert, K. J. (1986)
 Lipid peroxidation in higher plants
Plant Physiol., **82**, 700-702

Schmidt, B. (1985)
 Isolierung und Strukturaufklärung von Chlorophyllabbauprodukten
Dissertation, Universität München

Schmidt, S., Drumm-Herrel, H., Oelmüller, R. und Mohr, H. (1987)
 Time course of competence in phytochrome-controlled appearance of nuclear-enclosed plastidic proteins and messenger RNAs.
Planta, **170**, 400 - 407

Schoch, S., Lempert, U. und Rüdiger, W. (1977)
 Über die letzten Stufen der Chlorophyll - Biosynthese
Z. Pflanzenphysiol., **89**, 427 - 436

Schönbeck, F. und Meyer, H. (1985)

Zusammenhänge zwischen Schädigungen des Feinwurzelsystems einschließlich der Mykorrhiza und dem Auftreten neuartiger Waldschäden

Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich, Nr. 369, 432 - 434

Schönborn v., A. und Weber, E. (1981)

Untersuchungen über die Immissionsbelastung von Tannen- und Fichtennadeln im Bereich des Bayerischen Waldes

Forstwiss. Cbl., 100, 265-270

Schütt, P., Blaschke H., Hoque, E., Koch, W., Lang, K. J. und Schuck, H. J. (1983)

Erste Ergebnisse einer botanischen Inventur des "Fichtensterbens"

Forstwiss. CBL., 102, 158 - 166

Schütt, P. und Cowling, E. B. (1985)

Waldsterben, a general decline of forests in central Europe: symptoms, development, and possible causes

Plant Disease, 69

Schütt, P. (1985)

Das Waldsterben - eine Pilzkrankheit?

Forstwiss. Cbl., 104, 169 - 177

Schütt, P. (1986)

Zum Schadbild des Waldsterbens

Forstarchiv, 57, 8-11

Seely, G. R. (1966)

Structure and chemistry of functional groups

In: Vernon, L. P. und Seely, G. R. (Hrsg.), The Chlorophylls, 86 - 87

Academic Press New York, San Francisco, London

Senser, M. und Beck, E. (1979)

Kälteresistenz der Fichte II. Einfluß von Photoperiode und Temperatur auf die Struktur und photochemischen Reaktionen von Chloroplasten

Ber. Dtsch. Bot. Ges., 92, 243-249

Senser, M., Höpker, K.-A., Peuker, A. und Glashagen, B. (1987)

Wirkungen extremer Ozonkonzentrationen auf Koniferen

AFZ, 27/28/29, 709-714

Seufert, G. und Arndt, U. (1986)

Beobachtungen in definiert belasteten Modellökosystemen mit jungen Waldbäumen

AFZ, 22, 545 - 548

Shimazaki, K., Sakaki, T., Kondo, N. und Sugahara, K. (1980)

Active oxygen participation in chlorophyll destruction and lipid peroxidation in SO₂-fumigated leaves of spinach

Plant and Cell Physiol., 21, 1193-1204

Siegenthaler, P. A. (1968)

Synergistic effects of light and aging on the swelling and photochemical activities of isolated chloroplasts

Experientia, 24, 1198-1190

Siegenthaler, P. A. (1972)

Aging of the photosynthetic apparatus. IV. Similarity between the effects of aging and unsaturated fatty acids on isolated spinach chloroplasts as expressed by volume change

Biochem. Biophys. Acta, 275, 182-191

Simini, M. und Leone, I. (1986)

Studies on the effects of de-icing salts on roadside trees

Jour. Arbor., 10, 221-231

Sironval, C. und Kandler, O. (1958)

Photooxidation processes in normal green chlorella cells.

I. The bleaching process

Biochem. Biophys. Acta, **22**, 359 - 215

Smidt, S. (1978)

Die Wirkung von photochemischen Oxidantien auf Waldbäume

Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz,

85, 689 - 702

Smith, K. M. (1975)

General features of the structure and chemistry of porphyrin compounds

In: Smith, K. E. (Hrsg.), Porphyrins and Metalloporphyrins, 1 - 28

Elsevier Scientific Publishing Company Amsterdam

Spiller, S. C., Kaufman, L. S., Thompson, W. F. und Briggs, W. R. (1987)

Specific m-RNA and r-RNA levels in greening pea leaves during recovery from iron stress

Plant Physiol., **84**, 409 - 414

Srivastava, H. S., Jolliffe, P. A. und Runeckles, V.C. (1975)

The effects of environmental conditions on the inhibition of the leaf gas exchange by NO₂

Can. J. Bot., **53**, 475-482

Srivastava, H.S. und Omrod, D.P. (1984)

Effects of NO₂ and nitrate nutrition on growth and nitrate assimilation in bean leaves

Plant Physiol., **76**, 418-423

Thimann, K. V. (1980)

The senescence of leaves

In: Thimann, K. V. (Hrsg.), Senescence in plants, 85 - 117

CRC Press Inc., Boca Raton, Florida

Thomas, M. D., Hendricks, R. H., Bryner, R. C. und Hill, G.

R. (1944)

A study of the sulfur metabolism of wheat, barley and corn
using radioactive sulfur

Plant Physiol., 19, 227-244

Thornber, J. P., Gary, F. P. und Nechushtai, R. (1987)

Biochemical composition and structure of photosynthetic
pigment- proteins from higher plants

Physiol. Plant., 71, 236 - 240

Ulrich, B. (1985)

Raten der Deposition, Akkumulation und des Austrags
toxischer Verunreinigungen als Maß der Belastung und
Belastbarkeit von Waldökosystemen

Spezielle Berichte der Kernforschungsanlage Jülich, Nr.
369, 424 - 426

Ulrich, B., Mayer, R. und Kanna, P. K. (1979)

Deposition von Luftverunreinigungen und ihre Auswirkungen
in Waldökosystemen im Solling

In: Schriftenreihe Forstl. Fak. Univ. Göttingen, 58

Sauerländers Verlag Frankfurt

Vlcek, J. M. und Gassman, M. L. (1979)

Reversal of α - and α' -dipyridyl-induced porphyrin
synthesis in etiolated and greening red kidney bean leaves

Plant Physiol., 64, 393 - 397

Vos, J. und Oyarzún, P. J. (1987)

Photosynthesis and stomatal conductance of potato leaves
- effects of leaf age, irradiance and leaf water potential
Photosynthesis Res., 11, 253 - 264

Wakhloo, I. L. (1986)

Störungen entwicklungsphysiologischer Natur bei bedrohten
Waldbäumen
AFZ, 11, 242 - 243

Wellburn, A. R., Wilson, J. und Aldridge, W., (1980)

Biochemical responses of plants to nitric oxide polluted
atmospheres
Environ. Pollut., 22 (Ser. A), 219-228

Wellburn, M. E., Higginson, C., Robinson, D. und Walmsley,
Ch. (1981)

Biochemical explanations of more than additive inhibitory
effects of lower atmospheric levels of sulfur dioxide plus
nitrogen dioxide upon plants
New Phytol., 88, 223-237

Whitmore, M. E. und Freer-Smith, P. H. (1982)

Growth effects of SO₂ and/or NO₂ on woody plants and grass
during spring and summer
Nature, 300, 55-57

Wild, A. (1979)

Die Anpassung an die Lichtbedingungen
Ber. Dtsch. Bot. Ges., 92, 341-364

Wild, A. und Bode, J. (1986)

Physiologische, biochemische und anatomische Untersuchungen
von immissionsbelasteten Fichten verschiedener Standorte
Beiträge zum IMA-Querschnittsseminar vom 2.- 4.12.1985 in
der Kernforschungsanlage in Jülich, 166-183

Wise, R. R. und Naylor, A. W. (1987)

Chilling enhanced photooxidation Evidence for the role of singlet oxygen and superoxide in the breakdown of pigments and endogenous antioxidants

Plant Physiol., 83, 278 - 282

Wittenbach, V. A. (1977)

Induced senescence of intact wheat seedlings and its reversibility

Plant Physiol., 59, 1039 - 1042

Wong, C. H., Klein, H. und Jäger, H.-J. (1977)

The effect of SO₂ on the ultrastructure of pisum and zea chloroplasts

Angew. Bot., 51, 311 - 319

Yamamoto, H. Y., Nakayama, T. O. M. und Chichester, C. O. (1962)

Biosynthetic origin of oxygen in the leaf xanthophylls

Arch. Biochem. Biophys., 96, 645

Yamamoto, H. Y. und Takeguchi, C. A. (1971)

Concepts on the role of epoxy-carotenoids in plants

Reprint from the IInd international congress on photosynthesis, Stresa, 621 - 627

Yoneyama, T. und Sasakawa, H. (1979)

Transformation of atmospheric NO₂ absorbed in spinach leaves

Plant Cell Physiol., 20, 263 - 266

Yoneyama, T., Totsuka, T., Hashimoto A. und Yazaki, J. (1980)

Absorption of atmospheric NO₂ by plants and soil IV. 2 routes of NO₂ up take by plants from atmospheric NO₂: Direct incorporation into aerial plant parts and uptake by

roots after absorption into the soil

Soil Sci. Pl. Nutr., 26, 1-7

Zech, H. W. und Popp, E. (1983)

Magnesiummangel, einer der Gründe für das Fichten- und Tannensterben in NO-Bayern

Forstw. Cbl., 102, 50 - 55

Zimmermann, D. C. und Vick, B. A. (1970)

Hydroperoxid isomerase. A new enzyme of lipid metabolism

Plant Physiol., 46, 445 - 453

Zöttl, H. W. (1985)

Die Rolle der Nährelementversorgung bei der Entwicklung "neuartiger" Waldschäden

VDI-Berichte, 560, 657 - 701

Zöttl, H. W. und Hüttl, R. (1985)

Schadsymptome und Ernährungszustand von Fichtenbeständen im süddeutschen Alpenvorland

AFZ, 9/10, 197 - 199

Zöttl, H. W. und Hüttl, R. F. (1986)

Nutrient supply and forest decline in Southwest-Germany

Water, Air and Soil Pollution, 31, 449 - 462

Zöttl, H. W. und Mies, E. (1983)

Die Fichtenerkrankung in den Hochlagen des Südschwarzwaldes

Allg. Forst- und Jagdzeitung, 154, 110 - 114

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen eines Forschungsprojekts des bayerischen Umweltministeriums (Aktenzeichen 6482-563-33512). Sie wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger am botanischen Institut der Universität München durchgeführt.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger danke ich herzlich für die hilfreichen Anregungen sowie für sein großes Interesse an dieser Arbeit und für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt ferner Frau Dr. Siegrid Schoch und Frau Dr. Margot Senger für die Unterstützung sowie Prof. Dr. Hugo Scheer und Priv. Doz. Dr. Cornelius Lütz für Ihre Hilfsbereitschaft.

Priv. Doz. Dr. Jürgen Soll danke ich für die Überlassung der Thylakoide. Herrn Werner Miller danke ich für die Bereitstellung von Fichtenproben. Herrn Dr. Rodenkirchen danke ich für die Überlassung der Moosproben aus dem Höglwald.

Ein Dankeschön geht ferner an Dr. Fritz Thümmeler, Dr. Song Guoging und an Frau Marlene Binder für die Unterstützung bei der Isolierung von RNA.

Frau Ingrid Katheder danke ich für die prompte Hilfe bei HPLC-Reparaturen. Ferner möchte ich mich auch bei Frau Ulrika Lempert für ihre Hilfsbereitschaft bedanken. Meinem Kollegen Kai Höpker danke ich für die zahlreichen Fachdiskussionen.

Zum Gelingen der Arbeit trugen nicht zuletzt das Verständnis und die Hilfsbereitschaft aller Mitglieder des Arbeitskreises bei. Ihnen sei an dieser Stelle herzlich gedankt.

Mein besonderer Dank gilt ferner Wolfgang Stang für seine Hilfe beim Formatieren und Korrigieren des "final print".

Meinen Eltern danke ich für ihre Unterstützung und auch meinem Bruder Burkhard sei für seine Geduld und Hilfsbereitschaft gedankt.

Lebenslauf

10.02.1957	Geburt in Aschaffenburg
1963 - 1967	Besuch der Volksschule in Alzenau
1967 - 1976	Besuch des neusprachlichen Gymnasiums in Alzenau mit dem Abschluß der allgemeinen Hochschulreife
Sept. 76 - Febr. 77	Aufenthalt in Kanada
April 1977	Beginn des Chemiestudiums an der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn
Oktober 1981	Hochschulwechsel an die Ludwig-Maximilians-Universität München
November 1983	Ablegung der mündlichen Diplomchemiker-Hauptprüfung
16.11.83 - 20.10.84	Diplomarbeit am organischen Institut der Universität München im Arbeitskreis Prof. Dr. Rudolf Knorr
01.12.84	Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Biochemie der Technischen Universität München im Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. Adalbert Bacher
Juni 85	Wechsel an den Lehrstuhl für Phytochemie, Botanisches Institut der Universität München
01.07.85	Beginn der Dissertation am Lehrstuhl für Phytochemie der Universität München unter Anleitung von Prof. Dr. Wolfhart Rüdiger

